



Titulació:

Grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales (GRETl)

Alumno (nombre y apellidos):

Nerea Fernández Ibarz

Título del trabajo de final de grado:

STUDY FOR NOVEL NANOCARRIERS FOR SKIN CARE

Director del TFG:

Tzanko Kaloyanov Tzanov

Supervisoras:

Eva Ramon Portés y Kristina Ivanova

Convocatoria de entrega del TFG:

15/01/2020. Ordinaria, cuatrimestre de otoño 2019-2020

Contenido:

MEMORIA Y ANEXOS

Resumen

Este trabajo describe la preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (Solid Lipid Nanoparticles - **SLN**) para el cuidado de la piel. Estas nanopartículas se generaron encapsulando los activos antioxidantes y antiaging, Q₁₀ y rutina, con sonoquímica y homogeneización a alta presión. Se presenta su preparación y caracterización, así como la actividad antioxidante y antiaging que tienen los activos encapsulados a través de ensayos de actividad específicos *in vitro* con reactivos químicos y, asimismo, se realizaron ensayos de biocompatibilidad y antioxidación a nivel celular y de ADN. Resultando unas SLN biocompatibles y con propiedades antioxidantes que podrían tener aplicaciones futuras en el cuidado de la piel.

Abstract

This report describes the preparation of solid lipid nanoparticles (**SLN**) for skin care. These nanoparticles were generated by encapsulating the antioxidant and antiaging actives (Q₁₀ and rutin) with sonochemistry and high-pressure homogenization. The NPs were prepared and characterized, then, their antioxidant and antiaging properties were analyzed through specific activity assays *in vitro* using chemical reagents. The biocompatibility of these SLN and the antioxidant activity that they present were also evaluated at a cellular and DNA level. As a result, biocompatible solid lipid nanoparticles with antioxidant properties, which could have future applications in skin care, were obtained.

Declaración de honor

I declare that,

the work in this Degree Thesis is completely my own work,

no part of this Degree Thesis is taken from other people's work without giving them credit,

all references have been clearly cited,

I'm authorised to make use of the research group related information I'm providing in this document.

I understand that an infringement of this declaration leaves me subject to the foreseen disciplinary actions by *The Universitat Politècnica de Catalunya - BarcelonaTECH*.

Nerea Fernández Ibarz

Student Name

Signature

15/01/2020

Date

Title of the Thesis: Study for novel nanocarriers for skin care

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Tzanko Tzanov, que me presentó la oportunidad de hacer el trabajo final de grado en su laboratorio, por incluirme en las actividades del grupo y por ayudarme siempre que lo necesitaba de forma rápida y comprensiva.

También quiero agradecer a Eva Ramon y Kristina Ivanova, por tener la paciencia necesaria para explicarme un tema el cual no había estudiado nunca, por resolver mis dudas en todo momento y a cualquier hora, por darme consejos esenciales a la hora de la realización del trabajo y por la ayuda que he recibido en general por su parte durante todo el proceso.

Agradecer a todo grupo del laboratorio en general por hacer que la faena en el laboratorio me resultara más sencilla.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis compañeros y amigos por ayudarme y aconsejarme durante todo el proceso de realización del TFG y quiero dar especial agradecimiento a mis padres, Laura Ibarz y Carlos Fernández, por ser comprensivos, ayudarme y apoyarme en todo momento tanto académicamente como personalmente.

Contenido

Resumen	i
Abstract	i
Declaración de honor	ii
Agradecimientos	iii
Lista de figuras	vi
Lista de gráficas	vii
Lista de tablas	viii
Lista de esquemas	ix
Glosario	x
1. Objetivo	1
2. Alcance	1
3. Requerimientos	1
4. Justificación.....	2
5. Introducción.....	3
5.1. Nanopartículas.....	3
5.2. Nanopartículas Sólidas Lipídicas (SLN).....	4
5.3. Envejecimiento de la piel	6
5.3.1. Agentes antioxidantes y antienvjecimiento	8
6. Metodología experimental	11
6.1. Material y equipo	11
6.1.1. Equipo utilizado	11
6.1.2. Material utilizado	17
6.2. Resultados y Discusión	20
6.2.1. Preparación de las nanopartículas	20
6.2.2. Caracterización de la medida y potencial zeta	24
6.2.3. Actividad antioxidante (DPPH).....	26
6.2.4. Inhibición de la elastasa y colagenasa	31
6.2.5. Ensayos a nivel celular	36
6.2.5.1. Biocompatibilidad	38
6.2.5.2. Actividad Antioxidante a nivel Celular (CAA).....	40
6.2.5.3. Reacción de las células HaCat ante luz UV	43
6.2.6. Ensayos con ADN.....	46

6.2.6.1. Purificación del ADN.....	46
6.2.6.2. Prevención de la oxidación en ADN	47
7. Presupuesto	52
8. Implicaciones ambientales	52
9. Conclusiones.....	54
10. Recomendaciones.....	55
11. Referencias	55
Anexo A.- Proceso de ultrasonido en la preparación de las SLN	59
Anexo B.- Comprobación de resultados	61
Anexo C.- Cálculos de los ensayos a nivel celular	63
Anexo D.- Gráficas de biocompatibilidad para diferentes concentraciones	66
Anexo E.- Cambio de color en placas por efecto de AlamarBlue	68
Anexo F.- CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04%	69
Anexo G.- Cálculos en ensayos con ADN.....	70
Anexo H.- Ensayo prevención de la oxidación en ADN con concentración del 20 %.....	71

Lista de figuras

Figura 1 Capas de la piel.	6
Figura 2 Envejecimiento causado por el tabaco.....	7
Figura 3 Envejecimiento a causa de los rayos ultravioleta	8
Figura 4 Ubiquinona (Q ₁₀)	9
Figura 5 Rutina (Ru).....	10
Figura 6 Equipo de ultrasonido de alta intensidad.....	11
Figura 7 Equipo de baño de ultrasonido.....	12
Figura 8 Homogeneizador.....	12
Figura 9 Centrifugadoras.....	13
Figura 10 Zetasizer Nano ZSP	13
Figura 11 Tecacn/Infinite M200 NanoQuant microplate reader	14
Figura 12 Incubador NUAIRE US Autoflow	14
Figura 13 Grant OLS 200	15
Figura 14 Equipo de electroforesis.....	15
Figura 15 Microscopio Olympus CK 30	16
Figura 16 Microscopio NICKON / Eclipse Ti-S	16
Figura 17 BioRad (Chemidoc XRS).....	17
Figura 18 Muestras de nanopartículas generadas purificadas.	23
Figura 19 Controles en actividad antioxidante (DPPH)	28
Figura 20 Muestras después de centrifugar	29
Figura 21 Células HaCat y células BJ5ta	36
Figura 22 Cuadrícula de cámara Neubauer	37
Figura 23 Placa sometida a rayos UV	44
Figura 24 Viabilidad de las células HaCat.....	45
Figura 25 Recorrido de las muestras por efecto de un campo eléctrico.....	51
Figura 26 Prevención de la oxidación en ADN. Bandas fluorescentes.....	51
Figura 27 Componente Alamarblue y placa con los colores que se pueden obtener (azul y rosa)	68
Figura 28 Cambio de color en placa de ensayo de biocompatibilidad en diferentes concentraciones.....	68
Figura 29 Prevención de la oxidación en ADN. Bandas de fluorescencia.....	71

Lista de gráficas

Gráfica 1 Tamaño de las nanopartículas.....	24
Gráfica 2 Potencial Zeta de las nanopartículas	25
Gráfica 3 Cambio de absorbancia en la reducción del radical DPPH.....	27
Gráfica 4 Actividad antioxidante a través de la capacidad de atrapar radicales libres utilizando DPPH.....	30
Gráfica 5 Fluorescencia del control positivo en ensayo de inhibición a la elastasa	34
Gráfica 6 Fluorescencia del control positivo en ensayo de inhibición a la colagenasa	34
Gráfica 7 Inhibición a la elastasa.....	35
Gráfica 8 Inhibición a la colagenasa.....	35
Gráfica 9 Biocompatibilidad con muestras a una concentración del 2,08 % en células HaCat y BJ5ta	39
Gráfica 10 Actividad antioxidante a nivel celular en células HaCat	42
Gráfica 11 Actividad antioxidante a nivel celular en células BJ5ta	42
Gráfica 12 Comprobación de resultados de actividad antioxidante utilizando el radical DPPH.....	61
Gráfica 13 Comprobación de resultados en inhibición a la elastasa	61
Gráfica 14 Comprobación de resultados en inhibición de la colagenasa	62
Gráfica 15 Ensayo de biocompatibilidad (29 de octubre del 2019)	62
Gráfica 16 Biocompatibilidad para diferentes concentraciones en células HaCat	66
Gráfica 17 Biocompatibilidad para diferentes concentraciones en células BJ5ta	66
Gráfica 18 Ensayo de biocompatibilidad para concentraciones de 4,16 % y 2,08 %	67
Gráfica 19 CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04 % en células HaCat .	69
Gráfica 20 CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04 % en células BJ5ta ..	69

Lista de tablas

Tabla 1 Grado de polidispersidad.....	24
Tabla 2 Cambio de color de las muestras Ru y Q ₁₀ /Ru. Con concentraciones del 50 % y 12,5 %, respectivamente, por efecto del radical DPPH	29
Tabla 3 Valores de absorbancia del ADN	70

Lista de esquemas

Esquema 1 Diferencia entre nanoesferas y nanocápsulas	4
Esquema 2 Diferencia entre nanoemulsión y partícula sólida lipídica.....	5
Esquema 3 Preparación de la fase lipídica	21
Esquema 4 Preparación de la fase acuosa con surfactante	22
Esquema 5 Proceso de homogeneización	23
Esquema 6 Potencial Zeta	25
Esquema 7 Estabilidad e inestabilidad de un coloide.....	26
Esquema 8 Muestras de ensayo en actividad antioxidante (DPPH)	28
Esquema 9 Muestras de ensayo en inhibición a la elastasa	32
Esquema 10 Muestras de ensayo en inhibición a la colagenasa	32
Esquema 11 Placas para ensayo de inhibición de las enzimas elastasa y colagenasa	33
Esquema 12 Placa de ensayo de biocompatibilidad	38
Esquema 13 Proceso de actividad antioxidante a nivel celular	40
Esquema 14 Muestras de ensayo en concentraciones de 4,16 %y 2,08 % en CAA.....	41
Esquema 15 Placas de 6 pozos para ensayo de reacción de células HaCat a los rayos UV	44
Esquema 16 Controles de ensayo en prevención de oxidación en ADN	48
Esquema 17 Proceso elaboración de gel de agarosa para electroforesis.....	50
Esquema 18 Proceso de obtención de SLN vacías	59
Esquema 19 Proceso de obtención de SLN con ubiquinona	59
Esquema 20 Proceso de obtención de SLN con Rutina.....	60
Esquema 21 Proceso de obtención de SLN con ubiquinona y Rutina	60

Glosario

AAPH	Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (a-amidinopropano)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
CAA	Actividad antioxidante celular
DCH-DA	2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato
DCFH	diclorofluorescina
DMEM	Dulbecco modified Eagles minimal essential
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>Eppendorf</i>	Tubo de plástico de microcentrífugo empleado en laboratorio
EthD-1	Homodímero de etidio
<i>Falcon</i>	Tubo de ensayo de plástico.
FBS	Suero fetal bobino
FeSO ₄	Sulfato de hierro (II)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	Solución Equilibrada de Hanks
mQH ₂ O	Agua miliQ: Agua purificada y desionizada en alto grado por un sistema de purificación de agua fabricado por Millipore Corporation.
NPs	Nanopartículas
PBS	Tampón fosfato salino
PVA	Alcohol polivinílico
Q ₁₀	Coenzima Q ₁₀ o Ubiquinona
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Ru	Rutina
SLN	Nanopartículas solidas lipídicas

1. Objetivo

El objetivo principal de este estudio es validar nuevas nanopartículas (**NPs**) lipídicas para el cuidado de la piel. Estos vehículos de tamaño nanométrico contienen activos antienvjecimiento y han estado generados a través de sonoquímica y homogeneización a alta presión. También se determinará las propiedades antioxidantes y antiarrugas de estos activos encapsulados y la biocompatibilidad de las NPs.

2. Alcance

El estudio constará de los apartados descritos a continuación con tal de poder cumplir con el principal objetivo.

- Búsqueda bibliográfica del envejecimiento de la piel y las estrategias utilizadas en la actualidad.
- Descripción de los métodos existentes en la actualidad para la generación de NPs destinadas a aplicaciones en la piel.
- Preparación de los vehículos nanoestructurados que contienen activos antienvjecimiento a través de sonoquímica y de homogeneización a alta presión.
- Caracterización fisicoquímica de las NPs a partir de la determinación del tamaño, índice de polidispersidad y estabilidad a través de la medida del potencial Zeta.
- Evaluación de las propiedades antioxidantes y antiarrugas a partir de la capacidad de inhibición de dos de las enzimas formadoras de arrugas: colagenasa y elastasa, y su biocompatibilidad.
- Procesamiento y discusión de los resultados obtenidos.

3. Requerimientos

Las limitaciones de este estudio son los siguientes:

- Existe una gran variedad de activos con las propiedades que se quiere validar. Este estudio se limitará a realizar ensayos con ubiquinona

(coenzima **Q₁₀**) y el flavonoide natural quercetin-3-rutinósido (**Rutina**) como compuestos modelo.

- Los test se llevarán a cabo en el laboratorio que el grupo tiene en el edificio GAIA utilizando sus instrumentos, las metodologías desarrolladas por el propio grupo y siguiendo las normativas de seguridad del mismo laboratorio.

4. Justificación

La tecnología aplicada en este trabajo ofrece un enfoque inteligente para el transporte de activos mediante un vehículo en forma de partícula de tamaño nano, tales como nanocápsulas, nanoesferas o liposomas, que favorecen la absorción a través de la piel y modulan la liberación de estos activos en la capa correspondiente. De estas nanopartículas se trabajará con las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN, del inglés Solid Lipid Nanoparticles), preparadas a partir de una formulación hidrofóbica que facilita la penetración en la piel y protege a los componentes encapsulados. (Oehlke et al., 2017) Existen muchos tipos de cosméticos transdérmicos y dérmicos con activos antioxidantes y antiarrugas, pero el mayor problema de éstos es la pobre penetración en la piel (Sahu et al., n.d.). Con la utilización de estas SLN, de composición lipídica, se pueden encapsular activos poco solubles en agua, para una mejor penetración en la piel, superando las principales barreras y así alcanzar la profundidad necesaria para la liberación y actuación de los activos.

El interés en el cuidado de la piel y en los cosméticos antiedad capaces de rejuvenecer la apariencia de una persona ha ido incrementando a lo largo de los años. Las personas quieren sentirse aceptadas y muchos padecen el miedo a envejecer (gerascofobia) a causa de la sociedad y los estereotipos del momento. Está claro que el aspecto que tiene la piel también depende de los genes, pero, si se sabe prevenir el envejecimiento en la piel se puede llegar a reducir los efectos visuales que causa la edad.

En este estudio se quiere preparar partículas nanoestructuradas de matriz lipídica (SLN) que contengan activos antienvjecimiento (antioxidantes y antiarrugas) y determinar su estabilidad, tamaño, biocompatibilidad, así como validar la efectividad antiedad de los activos encapsulados para que en un futuro se pueda implementar en productos para el cuidado de la piel.

5. Introducció

5.1. Nanopartícules

“La nanotecnologia comprèn el estudi, disseny, creació, síntesis, manipulació i aplicació de materials, aparells i sistemes funcionals a través del control de la matèria i la explotació de fenòmens i propietats de la mateixa a nano escala.” (Garzón Serra & Fernández, 1953)

La nanomedicina és la branca de la nanotecnologia aplicada en el camp de la salut, i el seu avanç està dirigit al disseny de les partícules, materials i/o dispositius nanomètrics per a que i) puguin entrar fàcilment en la majoria de les cèl·lules sense activar la resposta immunitària, ii) interaccionen amb els sistemes biològics d'una manera més directa, més eficient i més precisa que els sistemes i fàrmacs utilitzats actualment, i iii) siguin capaços d'accedir a àrees del cos a les que ha estat difícil penetrar amb les tecnologies actuals. (Garzón Serra & Fernández, 1953)

Existen diversos tipus de sistemes de entrega, entès com al vehicle capaç de transportar els actius, utilitzats en productes cosmètics: liposomes, niosomes, microemulsions, nanoemulsions, micropartícules i nanopartícules. (Sahu et al., n.d.) Aquestes últimes, presenten millores respecte als altres sistemes ja que tenen major estabilitat i una capacitat de liberació més controlada. (Llabot and Palma 2008). Per altra banda, tenen avantatges sobre les micropartícules, ja que, al tenir un mida menor a 5 µm, poden garantir que les partícules no causen embòlies, ja que els petits capil·lars sanguinis tenen 5-6 µm de diàmetre. (Llabot & Palma, 2008)

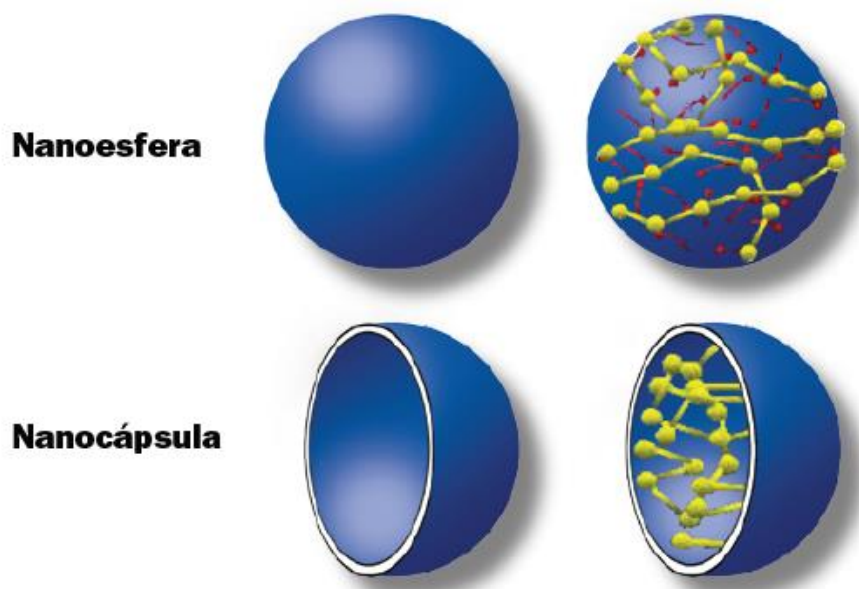
Les nanopartícules (**NPs**) es poden definir com sistemes col·loïdals amb un diàmetre inferior a 100 nm. (Garzón Serra and Fernández 1953; Sahu et al. n.d.). Encara que, el mida “nano” es defineix per la seva aplicació, per exemple, en encapsulació, el mida és superior als 100 nm, ja que les partícules contenen substàncies en el seu interior i necessiten més espai. Per altra banda, en el cas de les partícules que actuen sobre si mateixes, el mida pot ser de 5 nm a 10 nm. Per tant, el mida de les nanopartícules dependrà de la seva aplicació sent sempre menor a 1 micra.

Les característiques més importants de les NPs són el seu mida, la seva càrrega superficial i el control en la liberació dels actius. Actualment, les NPs s'estan incorporant en diferents camps de investigació i en el camp de l'administració de fàrmacs ja que tenen la capacitat de subministrar una àmplia gamma de compostos a través de diferents vies d'administració (subcutània, oral, entre altres mètodes) per períodes de temps sostenut (Llabot & Palma,

2008). En el caso de los cosméticos, se utilizan para i) mejorar la compatibilidad y la eficacia del transporte de los activos y ii) proteger a estos activos ante la oxidación y otros efectos dañinos del ambiente exterior.

Las NPs se pueden dividir en dos grandes grupos; las nanoesferas y las nanocápsulas; y se diferencian por cómo los ingredientes activos se pueden incorporar a las NPs; (Garzón Serra & Fernández, 1953) las nanoesferas son un sistema matricial y las nanocápsulas un sistema de depósito que consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica. (Llabot and Palma 2008)

Los ingredientes activos se pueden incorporar a las NPs de diferentes formas; disuelta en la matriz, absorbida en la superficie o disuelta en la fase líquida. (Garzón Serra & Fernández, 1953)



Esquema 1 Diferencia entre nanoesferas y nanocápsulas

Referencia: Garzón Serra and García Fernández. (1953) "Las Nanopartículas Sólidas Lipídicas y Los Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados En Usos Terapéuticos.": 1–14.

Así pues, los sistemas coloidales de suministro de sustancias activas son un área con rápido desarrollo que ha contribuido significativamente al suministro de activos de manera controlada y localizada. (Villafuerte Robles et al., 2008)

5.2. Nanopartículas Sólidas Lipídicas (SLN)

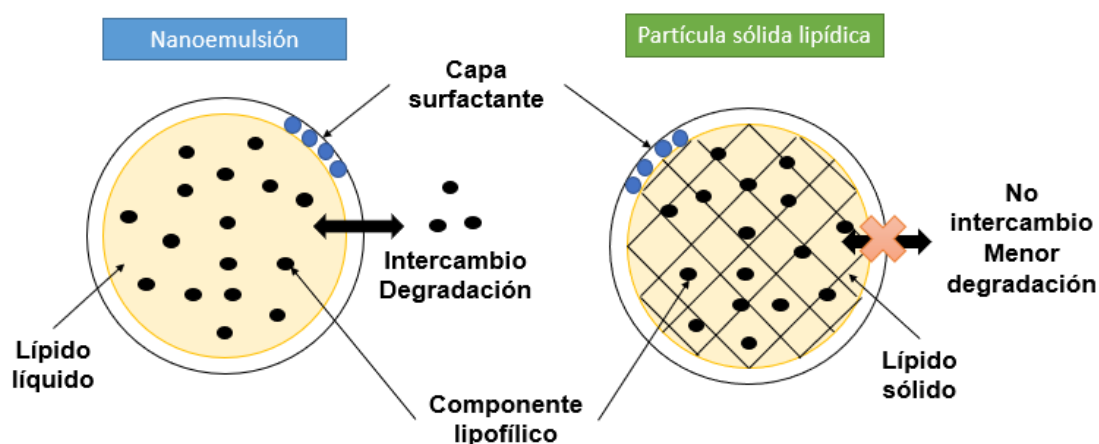
Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) se empezaron a desarrollar a principios de 1990 (Garzón Serra & Fernández, 1953), como un sistema de administración de sustancias activas (Wang et al., 2012) y como una alternativa a las emulsiones, liposomas y las nanopartículas poliméricas. Dando lugar a un

nuevo sistema con las ventajas presentes en los anteriores. (Garzón Serra and Fernández 1953; Villafuerte Robles et al. 2008)

Algunas de las ventajas incluyen; su excelente estabilidad física, biodisponibilidad, protección de las sustancias susceptibles a degradarse bajo la influencia de agentes externos (luz, agua),(Villafuerte Robles et al., 2008) liberación controlada (rápida o sostenida) (Wissing, Kayser, and Müller 2004) También permiten la utilización de lípidos fisiológicos en su formulación y la posibilidad de ser utilizadas cutáneamente, por vía oral y por vía intravenosa, a través de pomadas, cápsulas, soluciones inyectables, entre otros. (Garzón Serra and Fernández 1953; Villafuerte Robles et al. 2008). Como principal desventaja encontramos la agregación de las partículas durante el almacenamiento, tendencia a gelificar y su poca capacidad de cargar activos por los cristales de los lípidos sólidos.(Garzón Serra and Fernández 1953; Villafuerte Robles et al. 2008; Wissing, Kayser, and Müller 2004)

Las SLN son partículas con una matriz lipídica y con un diámetro medio en el rango nanométrico. Además de los lípidos y los activos que contienen, las SLN también contienen tensioactivos y estabilizadores.(Wissing et al., 2004), estos se utilizan para reducir la tensión entre la fase líquida y sólida así como para estabilizar las propiedades de las NPs en la emulsión.

Las SLN, en comparación con las nanoemulsiones, se generan con lípidos sólidos, manteniéndolos en este estado (Wang et al., 2012). Las nanoemulsiones, al tener los lípidos en estado líquido, producen más intercambios con el exterior, en cambio, las SLN, al tener los lípidos dispersos en un medio acuoso, forman un sistema coloidal que permite el suministro de los activos de manera más controlada y localizada.(Garzón Serra & Fernández, 1953)



Esquema 2 Diferencia entre nanoemulsión y partícula sólida lipídica

5.3. Envejecimiento de la piel

El antienvjecimiento es un área clave en el desarrollo de nuevos productos. Actualmente un gran número de empresas dedicadas a la cosmética utilizan nanopartículas por su peculiaridad de entregar activos antienvjecimiento beneficiosos para la piel y aumentando su eficacia.(Sharma & Sharma, 2012)

La función principal de la piel es actuar como una barrera ante los factores externos, ayudando, asimismo, a controlar la temperatura, el equilibrio de líquidos y evitando infecciones. Sin embargo, a la hora de administrar activos, también resulta un proceso difícil puesto que la piel también actúa como barrera ante ellos. Es por eso que se está implementando la nanotecnología en este ámbito, para poder promover la fácil administración de agentes antiedad y antioxidantes de forma más eficiente superando la barrera principal de la piel, el estrato córneo.(Sahu et al., n.d.)

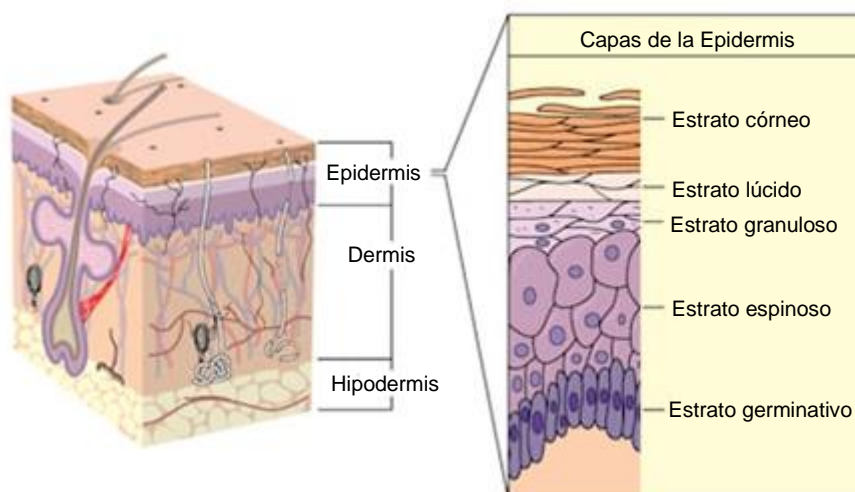


Figura 1 Capas de la piel.

Epidermis, dermis e hipodermis. Capas de la epidermis: Estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato germinativo. Referencia: Peter Lamb, Blamb ilustrators (n.d.) "Sección transversal de la piel, que muestra las distintas capas de la epidermis" Identificador de imagen: 44493562. En línea. Consultada el 05 de enero de 2020. Disponible en: https://es.123rf.com/photo_44493562_sección-transversal-a-través-de-la-piel-que-muestra-las-diversas-capas-de-la-epidermis-creado-en-adobe-il.html.

El conocimiento de las características del envejecimiento cutáneo nos permite entender los cambios que se presentan para anticiparnos a los cuadros clínicos causados por él y diseñar estrategias preventivas que nos permitan envejecer saludablemente. (Rueda, 2010) El envejecimiento es un proceso fisiológico determinado por múltiples factores externos e internos.(Rueda, 2010) Debido a estos factores, las fibras de colágeno y las fibras elásticas, presentes en el tejido dérmico de la piel, se modifican y se dañan causando la formación de arrugas y flacidez.(Sahu et al., n.d.). Los motivos por los que se acelera el envejecimiento actualmente están relacionados con una dieta pobre basada en comida

procesada, deshidratación, consumo de alcohol y tabaco, exposición excesiva al sol, entre otros motivos, que no solo afectan al estado de la piel, sino que también atentan contra la salud. Los factores involucrados en este proceso de envejecimiento pueden ser los factores biológicos y ambientales.



Figura 2 Envejecimiento causado por el tabaco

Comparación entre gemelos que tienen un largo historial como fumadores frente a sus hermanos gemelos que no consumen. Referencia: Okada, Haruko C M D, Alleyne, Brendan B. S; Varghai Kaveh; Kinder, Kimberly M D; Guyuron Bahman M. D. (2013) Plastic and Reconstructive Surgery: Volume 132 – Issue 5 – p 1085-1092

Los factores biológicos más resaltantes son la genética y el estrés oxidativo. En primer lugar, a la genética se le puede atribuir el 25 % del proceso del envejecimiento, el cual resulta inmodificable. (Rueda, 2010) Aunque no exista un gen claramente determinante del envejecimiento; los genes involucrados en enfermedades de la vejez o similares al proceso de envejecimiento, están implicados en el estrés oxidativo, la reparación del ADN y la inflamación.

El estrés oxidativo, se refiere a los eventos químicos necesarios para proporcionar energía a la célula; la oxidación y la reducción, produciendo sustancias necesarias para su funcionamiento. Estas sustancias, conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS, en inglés reactive oxidative species), (Sharma & Sharma, 2012) resultan ser muy reactivas con otras, produciendo así sustancias tóxicas para el organismo. (Rueda, 2010) Las ROS juegan un papel importante en el envejecimiento de la piel. Alrededor del 1,5-5 % del oxígeno consumido se convierte en ROS por procesos intrínsecos. Así pues, las ROS se producen continuamente y se consideran la causa principal del envejecimiento intrínseco. (Wang et al., 2018)

La radiación ultravioleta sería uno de los factores ambientales más conocidos e importantes en el proceso de envejecimiento. Éste causa el 90 % del envejecimiento cutáneo. La luz ultravioleta genera reacciones moleculares, excesiva regulación de las metaloproteinasas y estimulación de enzimas que degradan la matriz extracelular como la colagenasa y la elastasa. (Rueda, 2010)



Figura 3 Envejecimiento a causa de los rayos ultravioleta

La imagen muestra a un hombre canadiense de 69 años de oficio camionero. Éste expuso el lado izquierdo de su rostro al sol durante 28 años conduciendo por las carreteras. Referencia: Jennifer R. S. Gordon M. D. and Joaquin C. Brieve, M. D. "Unilateral Dermatoheliosis". Northwestern University, Chicago, IL April 19, 2012.

Otro factor que influye en el envejecimiento es el factor mecánico. Este se refiere a la capacidad que tiene la piel de estar adherida a los músculos, así permite una coordinación entre ambos. Sin embargo, a lo largo de los años ésta se va estirando a causa de los continuos movimientos y gestos lo cual hace que los puntos de anclaje se pierdan y se acentúen las líneas de expresión. (Rueda, 2010)

5.3.1. Agentes antioxidantes y antienvjecimiento

En el transcurso del envejecimiento, como se ha explicado anteriormente, se solapan dos procesos; un proceso intrínseco, relacionado principalmente con la oxidación celular, y un proceso extrínseco; en concreto, la radiación solar. Para reducir estos efectos, es esencial la aplicación de activos antioxidantes y antienvjecimiento. (Castaño Amores & Hernández Benavides, 2018)

En el mercado dermo-cosmético se desarrollan constantemente nuevos activos, a un ritmo que los dermatólogos no alcanzan a incorporar en su terapéutica y que vienen respaldados por informaciones de estudios hechos en los propios laboratorios que fabrican el producto. (Orlandi 2011). Por lo tanto, se pueden encontrar una gran variedad de activos para prevenir el envejecimiento cutáneo tales como Vitamina C, vitamina B3, Retinoides, Carotenoides, Polifenoles, entre otros (Castaño Amores & Hernández Benavides, 2018) Este trabajo se centra en la coenzima Q₁₀ (Q₁₀) también llamada ubiquinona y en el flavonoide natural Rutina (Ru).

5.3.1.1. Ubiquinona (Q₁₀)

La Ubiquinona (Q₁₀) [2,3, dimetoxi-5-metilbenzoquinona] es un compuesto producido por el propio organismo y es liposoluble. Su estructura química se compone de un anillo de quinona unido a 10 unidades laterales de isopreno (Stemmler, 2016). Pertenece a una familia de antioxidantes presentes de forma natural en todo el organismo a niveles variables. (Farboud et al., 2011; Fernández Guarino, 2019)(Farboud et al., 2011) Tienen una función vital en la última parte del ciclo de generación de energía celular, llamada cadena de transporte electrónico, donde se genera la mayor parte de la ATP (trifosfato de adenosina) (energía biológica) de las células. (Stemmler, 2016). La grasa y los carbohidratos entran en las coenzimas y se transforman en componentes más sencillos liberando así la energía que los mantenía enlazados, de esta forma se libera energía ATP. Concretamente, la Q₁₀ actúa como agente de transferencia de protones en la membrana, lo cual es la base para captar energía y formar ATP. (Stemmler, 2016)



Figura 4 Ubiquinona (Q₁₀)

Coenzima Q₁₀. Referencia: Elena Bellver. Alimentos ricos en coenzima Q₁₀. OkDiario. (18 de diciembre del 2016). En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://okdiario.com/recetas/alimentos-ricos-coenzima-q10-31661>.

Este activo tiene efectos beneficiosos sobre el corazón, los pulmones, el hígado y la piel. La Ubiquinona (Q₁₀) es un excelente antioxidante (Stemmler, 2016) además de otros efectos para el tratamiento la piel, que incluyen la prevención del envejecimiento a causa de los rayos ultravioleta, (Hoppe et al., 1999) disminución de la profundidad de las arrugas (Farboud et al., 2011), aumento de la elasticidad. Por otra parte, también actúa como antiinflamatorio, como tratamiento potencial en la psoriasis (Kharaeva et al., 2009) y como prevención de cáncer cutáneo en pacientes de alto riesgo.(Fernández Guarino, 2019) Los niveles de Q₁₀ disminuyen con la edad y con la exposición a los rayos ultravioletas. (Fernández Guarino, 2019) La falta de energía celular en personas mayores está relacionada con la baja producción de esta coenzima, además, suele haber deficiencia en enfermos con diabetes, cáncer, fallo cardíaco y aquellos con altos niveles de colesterol.(Stemmler, 2016)

5.3.1.2. Rutina (Ru)

La Rutina (Ru) [quercetina-3-b-D-rutinósido], también conocida como vitamina P, es un glucósido de quercetina que forma parte de la familia de los flavonoides, y más concretamente dentro del grupo de citroflavonoides, un grupo aromático (Choi et al., 2016; Isaac et al., 2009) (Isaac et al., 2009). Estos, comprenden un grupo de compuestos poli fenólicos ampliamente presente en frutas y vegetales, sobre todo en uvas, manzanas, cebollas, cerezas y repollos (Isaac et al., 2009) así como en el té negro, verde, la cerveza o el vino tinto (Pérez Trueba & Martínez Sánchez, 2001), se encuentran en numerosos alimentos, logrando más de 5.000 distintos flavonoides.

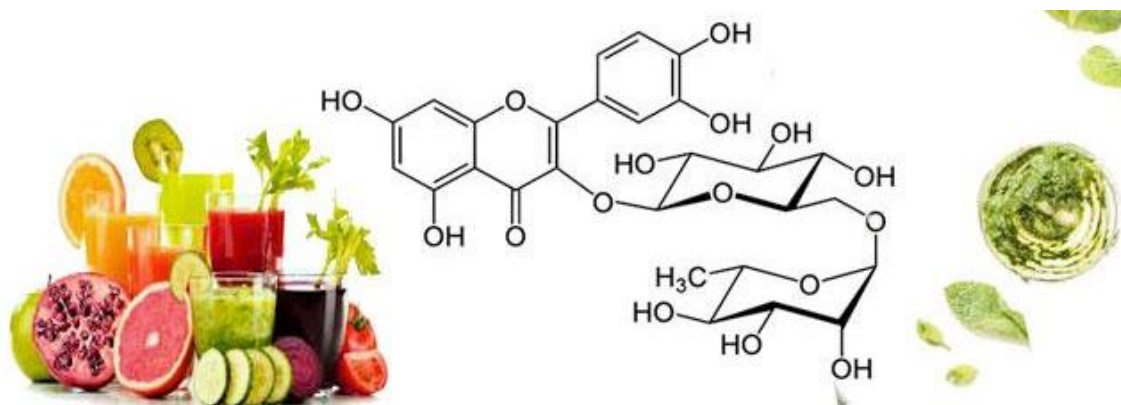


Figura 5 Rutina (Ru)

Rutina es un flavonoide que se encuentra en numerosos alimentos, algunos ejemplos se encuentran en la imagen. Referencia: Equipo de flavonoides.org. Rutina flavonoide. Propiedades y como tratarlo. En línea. Consultado 05 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.flavonoides.org/rutina/>

La actividad antioxidante de estos flavonoides resulta una combinación de sus excelentes propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL), así como de la inhibición de oxidasas. Otros mecanismos podrían incluir la inhibición de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos. De esta forma los flavonoides pueden interferir, no sólo en las reacciones de propagación de radicales libres, sino también con la formación de estos. (Pérez Trueba & Martínez Sánchez, 2001). Es el caso de la Rutina (Ru), con propiedades antioxidantes, reduciendo los niveles de ROS y eliminando los radicales superóxidos. (Choi et al., 2016). También tiene propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, antivirales y anticancerígenas. Se ha demostrado que reduce el envejecimiento de la piel al fortalecer su densidad y elasticidad a través de la regulación de determinadas enzimas presentes en la matriz extracelular. (Choi et al., 2016; Isaac et al., 2009)

6. Metodología experimental

6.1. Material y equipo

En este apartado se mencionan todos los equipos, productos y materiales que se han empleado durante el estudio para ejecutar los ensayos. El material y equipamiento básico de laboratorio solo aparece en el documento **Presupuesto**.

6.1.1. Equipo utilizado

A continuación, se muestra una lista del equipo utilizado a lo largo de todo el estudio:

- **Equipo de ultrasonido de alta intensidad.** El ultrasonido de alta intensidad se utilizó en la preparación de las NPs, en el que, las ondas sonoras que se propagan en el medio líquido dan lugar a ciclos alternados de alta presión y baja presión, formando así las nanopartículas.



Figura 6 Equipo de ultrasonido de alta intensidad

- **Equipo de baño de ultrasonido.** Se utilizó para agitar las muestras antes de cada ensayo y así evitar agregaciones.



Figura 7 Equipo de baño de ultrasonido

Equipo de ultrasonido utilizado antes de cada ensayo para agitar las muestras. Referencia: James Products. Professional Sonic Range. En línea. Disponible en: <https://www.jamesproducts.co.uk/jpe-product.aspx?pg=3> Consultado 30 de diciembre del 2019.

- **Homogeneizador.** Equipo en el que chocaron las NPs en suspensión obteniendo así las NPs más homogéneas y de menor tamaño utilizando alta presión.



Figura 8 Homogeneizador

- **Centrifugadora.** En general, las centrifugadoras se utilizaron para separar los líquidos de los sólidos haciéndoles precipitar. La centrifuga de la izquierda (Figura 9) se utilizó a la hora de purificar grandes volúmenes de muestras, de esta forma, se separaron las NPs del material no encapsulado por ellas. La centrifuga central (Figura 9) se utilizó a la hora de hacer los ensayos con volúmenes inferiores a 2 mL para poder separar el material sólido de las muestras realizadas en cada ensayo. Por último, la centrifugadora restante, minicentrifugadora, se utilizó en los ensayos en los cuales se utilizaba para

precipitar pequeños volúmenes (inferior a 50 μL) de muestra que estaban en el tapón o en las paredes del tubo y facilitar su recogida.



Figura 9 Centrifugadoras

De Izquierda a derecha: Centrifugadora Beckman Coulter para falcons. Fuente propia. Centrifugadora Orto Alresa para eppendorfs. Referencia: FeriaVirtual Interempresas. Centrifugas de laboratorio. En línea: Disponible: <https://www.interempresas.net/quimica/Productos/Centrifugas-de-laboratorio.html#!Producto-Centrifugas-refrigeradas-Orto-Alresa-Biocen-22R-73033> Consultado el 30 de diciembre del 2019. Minicentrifugadora para eppendorfs. Referencia: 3B Scientific. Microcentrifugadora Piccola. En línea: Disponible en: https://www.3bscientific.es/microcentrifugadora-piccola-1005880-w48925,p_406_5644.html Consultado el 30 de diciembre de 2019.

- **Zetasizer Nano ZSP.** Analizador de tamaño de partícula de muestras diluidas utilizando la dispersión de la luz óptica. También incorpora un analizador de potencial zeta que utiliza dispersión de la luz electroforética para partículas a para evaluar la estabilidad de estas.



Figura 10 Zetasizer Nano ZSP

Equipo Zetasizer. Referencia: IESMAT. Zetasizer Nano ZS90. En línea. Disponible en: <https://iesmat.com/productos/AcODL000022/malvern-panalytical-ltd-zetasizer-nano-zs90/> Consultado el 27 de noviembre de 2019.

- **Tecan/ Infinite M200 NanoQuant microplate reader.** Equipo de lectura de absorbancia y fluorescencia a diferentes longitudes de onda para la realización de los distintos ensayos. El equipo utiliza un software diseñado para una fácil adquisición de los valores tanto de forma puntual como en ciclos de tiempo determinado.



Figura 11 Tecan/Infinite M200 NanoQuant microplate reader

Tecan Infinite Reader. Referencia: Biocompare. The buyer's guide for life scientist. Infinite 200 PRO Series Multimode Reader from Tecan Trading AG. En línea. Disponible en: <https://www.biocompare.com/12354-Fluorescence-Microplate-Reader-Multi-Detection-Microplate-Reader/3046451-Infinite-200-PRO-Series-Multimode-Readers/> Consulta el 27 de noviembre de 2019.

- **Incubador NUAIRE US Autoflow.** Equipo que permite mantener una temperatura de 37°C a una atmosfera humedecida de 5% en CO₂. Proporciona un entorno *in vitro* controlado y fiable para el crecimiento óptimo de células. El incubador se utilizó en todos los ensayos realizados con cultivos celulares



Figura 12 Incubador NUAIRE US Autoflow

*Referencia: Picclick. "Nuaire NU-4750 Autoflow Water-Jacketed CO2 Incubator 20gal *Parts or Repair*". En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://picclick.com/Nuaire-NU-4750-Autoflow-Water-Jacketed-CO2-Incubator-20gal-Parts-372782576873.html>*

- **Cabina de seguridad biológica NUAIRE clase II.** Equipo que proporciona una barrera de contención para trabajar de forma estéril y evitar contaminaciones en los ensayos con cultivos celulares.
- **Sistema de purificación de agua.** Sistema para obtener agua ultra pura (mQH₂O) con una resistividad de 18,2 MΩ·cm, filtrada y purificada.
- **Grant/ OLS 200. Sistema de incubación al baño maría.** Permite agitar las muestras manteniendo una temperatura constante y controlada. Lleva incluida una tapa que permite hacer los experimentos que requieren protección de la luz.



Figura 13 Grant OLS 200

Referencia, de izquierda a derecha: PickClic "Grant Scientific OLS200 Orbital shaker, Heated Water Bath" En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://picclick.com/Grant-Scientific-OLS200-Orbital-shaker-Heated-Water-Bath-112351026255.html> y FisherScientific. "Grant Instruments™ Stainless Steel Gabled Lid". En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.fishersci.se/shop/products/c/11400948>.

- **Equipo de electroforesis.** Este equipo permite la separación de mezclas de moléculas con carga eléctrica y de diferentes tamaños presentes en una solución aprovechando la diferente velocidad de migración cuando se aplica un campo eléctrico. En este trabajo se utilizó para el ensayo de prevención de la oxidación en el ADN.



Figura 14 Equipo de electroforesis

- **Microscopio Olympus CK 30.** Se utilizó para visualizar el estado de las células y contarlas en la cámara Neubauer.



Figura 15 Microscopio Olympus CK 30

Referencia: IMEB Inc. "Olympus CK30 Inverted Microscope". En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.imebinc.com/product/olympus-ck30-inverted-microscope/>:

- **Microscopio NICKON / Eclipse Ti-S.** Se utilizó para fotografiar las células utilizadas y poder visualizarlas con distintos filtros de fluorescencia para el ensayo de protección ante rayos UV.



Figura 16 Microscopio NICKON / Eclipse Ti-S

Referencia: Bimedis equipamiento médico nuevo y usado. "Microscopio NICKON / Eclipse Ti-S" En línea. . Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://es.bimedis.com/a-item/microscopios-nikon-eclipse-ti-s-749903>

- **Equipo de documentación de geles de electroforesis (BioRad Chemidoc XRS)** Equipo que permite ver las barras de ADN. Captura las imágenes de los geles de ADN. Con la luz UV detecta los ácidos nucleicos teñidos con bromuro de etidio.



Figura 17 BioRad (Chemidoc XRS)

Referencia: Medical Expo. El salón online del sector médico-sanitario. "sistema de documentación en gel con cámara CCD/ por quimioluminiscencia". En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.medicalexpo.es/prod/bio-rad/product-80676-750844.html>.

6.1.2. Material utilizado

▪ Preparación de las nanopartículas

Ácido polivinílico (PVA). Tensioactivo o surfactante polimérico no iónico de origen sintético. Es soluble en agua, completamente biodegradable y carece de toxicidad.

Ácido Palmítico. Ácido graso saturado de cadena larga utilizado como lípido en la preparación de las SLN.

Dimetilsulfóxido (DMSO). Líquido orgánico incoloro utilizado como disolvente.

Ubiquinona (Q₁₀) y Rutina (Ru) explicados en la sección 5.3.1.

▪ Actividad antioxidante con el radical DPPH

2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Radical libre estable que es neutralizado por un compuesto antioxidante provocando un cambio de color de violeta a amarillo que puede ser seguido a través de absorbancia a 734 nm.

Ácido ascórbico. Ácido orgánico hidrosoluble con propiedades antioxidantes. Ayuda a proteger de los daños causados por los radicales libres. También conocido como Vitamina C. Se utiliza como control antioxidante.

- **Inhibición de elastasa**

Kit EnzChek® Elastase Assay Kit (E-12056):

Sustrato para elastasa. ElastasaDQ elastin from bovine neck ligament, BODIPY FL conjugate: Molécula conjugada con un marcador fluorescente donde actúa la enzima elastasa. A medida que es degradado por la enzima aumenta la fluorescencia.

Elastasa, exclusivamente producido en el páncreas. Enzima encargada de la degradación de las fibras elásticas.

1X Reaction Buffer [1 M TrisHCl, pH 8.0, containing 2 mM sodium azide]. Sistema encargado de evitar grandes variaciones de pH. También denominados amortiguadores o tampones. Los buffers en general son soluciones de ácidos débiles y de sus bases conjugadas o de bases débiles y ácidos conjugados.

- **Inhibición de collagenasa**

Kit EnzCheck® Gelatinase/collagenase Assay kit

Sustrato para collagenasa. DQ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate. Molécula conjugada con un marcador fluorescente donde actúa la enzima collagenasa. A medida que es degradado por la enzima aumenta la fluorescencia.

Collagenasa, tipo IV. Enzima que rompe los enlaces peptídicos que forman el colágeno.

1X Reaction Buffer [0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 50 mM CaCl₂, 2 mM sodium azide, pH 7,6]. Buffer utilizado para permitir la reacción enzimática.

- **Ensayos a nivel celular**

Células **BJ5ta** (ATCC-CRL-4001). Fibroblastos. Tipo de célula que se encuentra en el tejido conectivo.

Células **HaCat**. (ATCC PCS-200-011). Tipo de célula que se encuentra mayoritariamente en la epidermis.

Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (**DMEM**). Medio de cultivo que permite el crecimiento celular *in vitro* proporcionando nutrientes esenciales requeridos por las células. Este medio está suplementado por 1 % de glutamina, 10 % FBS (sérum) y 1 % de antibiótico.

Tripsina. En cultivos celulares de células adherentes se usa para despegar las células de la superficie de crecimiento (placas de cultivo) y poder tenerlas en suspensión. Las células se mueren si están mucho tiempo en la tripsina, por ello se inhibe con el medio DMEM que contiene FBS, que tiene unos componentes que inhiben la acción de la tripsina.

Tampón fosfato salino (**PBS**). Buffer isotónico y no tóxico para las células. Se utiliza para lavar las células.

AlamarBlue. Reactivo que produce un cambio de color y una señal fluorescente en respuesta a la actividad metabólica de las células. Se utiliza para el análisis de la biocompatibilidad en las células.

2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (**DCH-DA**). Tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro, es hidrolizada por esterasas de la célula a diclorofluorescina (DCFH) que en presencia de H₂O₂ se convierte en su forma fluorescente (DCF)

Dihidrocloreuro de 2,2'-azobis (a-amidinopropano) (**AAPH**). Radical peróxido que inicia el proceso peroxidativo, generando a la vez otros radicales libres.

Solución Salina Equilibrada de Hanks (**HBSS**). Solución salina que se utiliza para mantener el pH de las células que se mantienen en condiciones sin CO₂, transportar, diluir y lavar células. Se utiliza este medio en vez del medio DMEM en el ensayo de actividad antioxidante puesto que HBSS no contiene el suero FBS, afectando a los resultados.

Homodímero de etidio (**EthD-1**). Colorante fluorescente que atraviesa las membranas celulares cuando están dañadas. Se utiliza para detectar células muertas. Al unirse con los ácidos nucleicos, aumenta su fluorescencia de color roja, siendo más visible que el verde proporcionado por la Calceína AM.

Calceína AM. Colorante que penetra en las células que están en buen estado. Se utiliza para determinar la viabilidad celular. La calceína AM no

fluorescente, en células vivas se vuelve fluorescente de color verde a causa de las esterasas intracelulares.

Sulfato de hierro (II) (**FeSO₄**). Compuesto químico iónico utilizado, junto con H₂O₂, para la producción de hidróxidos que reaccionan con el ADN.

ADN **Puc19**. Vector plásmido.

Agarosa. Polímero natural, polisacárido formado por galactosas alfa y beta extraídas de algas. Es soluble a temperaturas altas y al solidificarse forma una matriz inerte y no toxica por la que pasará el ADN mediante electroforesis.

Bromuro de etidio (**EtBr**): Agente intercalante y se utiliza para detectar el ADN.

Tampón **TAE**: Solución tampón utilizado en la preparación de la electroforesis. TAE se refiere a los componentes que contiene (Tris, Acético y EDTA). Permite mantener las moléculas de ADN con una carga negativa uniforme y constante.

Azul de bromofenol. Compuesto de color azul y con carga utilizado para comprobar el progreso de la electroforesis al tener menor tamaño que las moléculas de ADN.

Kit QIA Spin Miniprep.(Qiagen, 2012) Se utilizó para la purificación del ADN.

6.2. Resultados y Discusión

6.2.1.Preparación de las nanopartículas

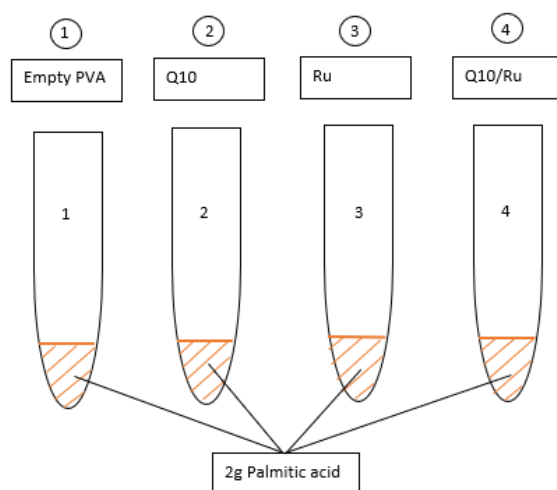
La preparación de las nanopartículas sólidas lipídicas se puede realizar a través de varios métodos, así como existen distintas formas de incorporar los activos en las partículas. Este trabajo se centra en las SLN preparadas con el método de emulsificación.

Este método consiste en la disolución de un polímero y el activo en un solvente orgánico. La emulsión se prepara mediante la adición de agua y un surfactante a la solución de polímeros. Las “nano-gotas”(Llabot & Palma, 2008) se forman a través del ultrasonido y una vez formadas, se disgregan en partículas nanométricas por homogeneización, repitiéndolo por varios ciclos. Las características principales de las SLN tales como el tamaño, el grado de

dispersión y el potencial zeta dependen de la naturaleza de la matriz del lípido, la mezcla de tensioactivos, la viscosidad de la fase lipídica y también por las condiciones de producción en la homogeneización.

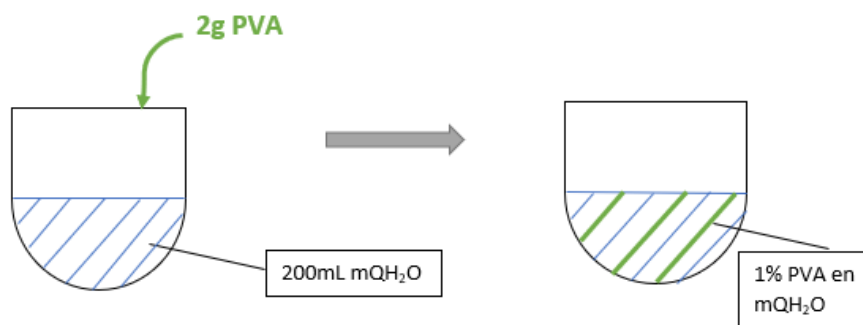
En este trabajo se prepararon cuatro muestras de SLN: la primera consistió en las nanopartículas vacías, es decir, no se le añadió ningún activo antiedad, de esta forma se pudo analizar si la composición de las NPs tenía algún efecto en los resultados. La segunda y tercera muestra consistieron en NPs que encapsularon el activo Q₁₀ y Ru, respectivamente. Por último, la cuarta muestra fueron nanopartículas que encapsularon los dos activos en conjunto, Q₁₀ y Ru.

En primer lugar, se preparó la fase lipídica mediante la fusión de los lípidos, perdiendo así su estructura cristalina original, esta fase constituyó la matriz de las nanopartículas. La capacidad de carga de activos en las NPs depende de las imperfecciones de la matriz, por lo cual el lípido tuvo que solidificarse de manera poco ordenada y presentar grandes distancias intermoleculares. Así pues, para poder realizarlo se añadieron 2 g de ácido palmítico (lípidos) para cada muestra y se calentaron a 80°C hasta que se derritieran.



Esquema 3 Preparación de la fase lipídica

La fase acuosa con surfactante, se trata de una disolución con una alta concentración de tensioactivos, en este caso se utilizó alcohol polivinílico (PVA). Éstos tienen un gran impacto en las propiedades de las SLN ya que son absorbidos por la superficie de las gotas de lípidos de la fase lipídica formando una barrera que les imparte estabilidad física, reduciendo las tensiones entre la fase líquida y sólida. El surfactante tiene un gran impacto en el tamaño de la partícula y el potencial zeta (Garzón Serra & Fernández, 1953). Se preparó una solución del 1 % de PVA en mQH₂O. Las muestras se prepararon con 45 mL para cada una de este surfactante.

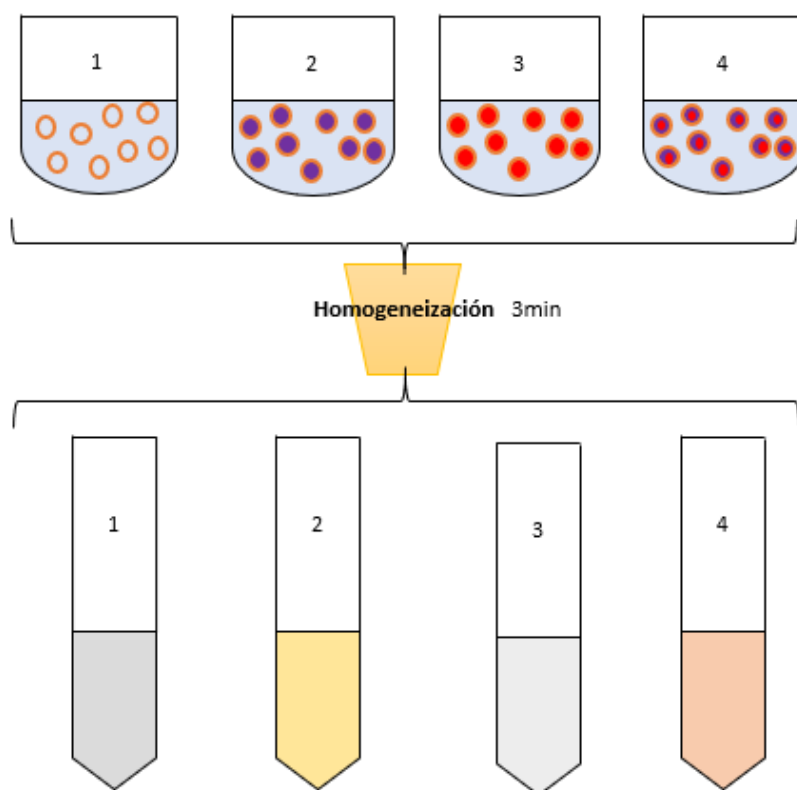


Esquema 4 Preparación de la fase acuosa con surfactante

Los activos que se utilizaron fueron Q₁₀ y Ru. El activo Ru se tuvo que disolver antes en dimetilsulfóxido (DMSO), un disolvente orgánico. Así pues, se preparó una solución con una concentración de 100 mg/mL. A las muestras con Ru, se les añadieron 15 µL de esta disolución, mientras que a las muestras con Q₁₀, se les añadieron 10 mg de este activo sin disolución previa.

Una vez se obtuvieron las dos fases, lipídica y acuosa, y los activos a añadir, se mezclaron mediante agitación con ultrasonido. El ultrasonido se utilizó para el procesamiento de la emulsión y generar así las NPs. Al sonicar la mezcla, las ondas sonoras que se propagan en el medio líquido dan lugar a ciclos alternados de alta presión y baja presión, con tasas que dependen de la frecuencia. Durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío. Cuando estas burbujas alcanzan un volumen al que ya no pueden absorber más energía, colapsan durante el ciclo de alta presión. Este fenómeno se denomina cavitación. Si esta burbuja implosiona cerca del límite de fases, la onda de choque resultante proporciona una mezcla de componentes muy eficiente. (Hielscher, 2007) (ver Anexo A donde se grafica el procedimiento seguido para las distintas muestras).

La disgregación de las burbujas o “nano-gotas” requiere de mucha energía por lo que el uso de homogeneización a alta temperatura y presión, se llevó a cabo en varios ciclos durante 3 minutos cada ciclo. La homogeneización se utiliza para reducir el tamaño de las partículas y mejorar su estabilidad y su uniformidad. La mezcla obtenida del ultrasonido se somete a una intensa turbulencia y a un campo de flujo de cizallamiento, obteniendo unas gotas uniformes. (Kumar, 2019)(Catalina Natalia Cheaburu-Yilmaz, 2019)



Esquema 5 Proceso de homogeneización

De izquierda a derecha: 1. Nanopartículas vacías, 2. Nanopartículas con Q_{10} , nanopartículas con Ru y 4. Nanopartículas con Q_{10} y Ru

Finalmente, las muestras obtenidas se centrifugaron para purificarlas separando la parte encapsulada de la no encapsulada.



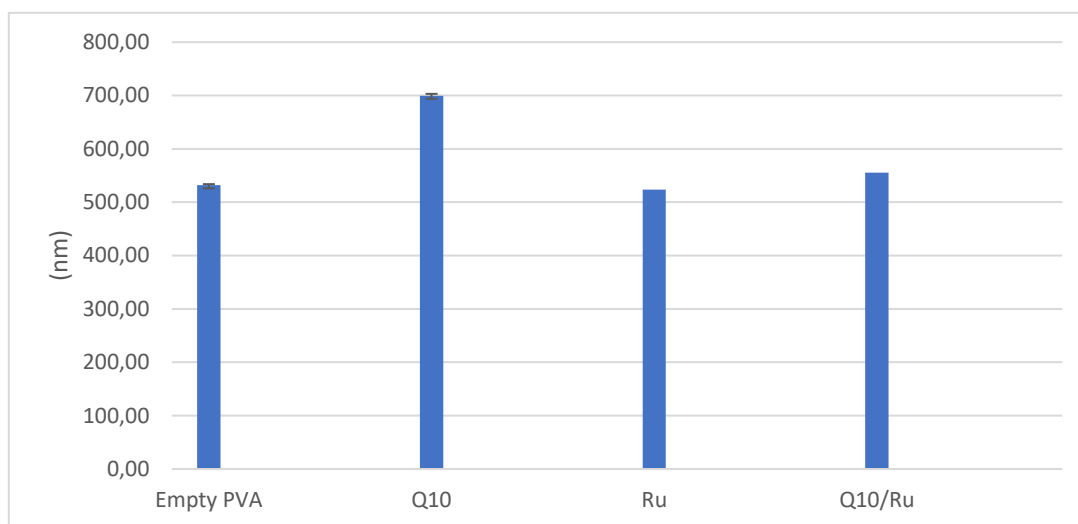
Figura 18 Muestras de nanopartículas generadas purificadas.

De izquierda a derecha: Nanopartículas vacías PVA, Nanopartículas con Q_{10} , Nanopartículas con Ru y nanopartículas con Q_{10} y Ru.

Estas cuatro muestras de SLN con los activos a estudiar, Q_{10} y Ru, se utilizaron en los distintos ensayos realizados a lo largo de este trabajo.

6.2.2. Caracterización de la medida y potencial zeta

El Zetasizer (explicado en la sección 6.1.1.) es el equipo utilizado para medir el tamaño de las partículas que se han generado, así como el potencial zeta. Para saber el tamaño de las NPs de las diferentes muestras, éstas se disolvieron en mQH₂O para que el equipo pudiera leer bien el tamaño. El zetasizer midió el tamaño de las partículas y la polidispersidad que presentaron.



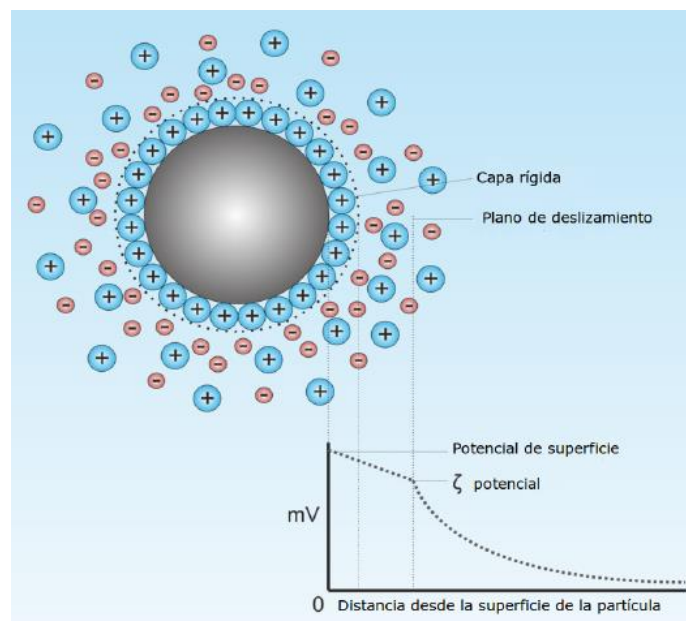
Gráfica 1 Tamaño de las nanopartículas

Como se puede ver en la gráfica 1, las NPs de las muestras son de 500 nm a 700 nm. Las más grandes son las que contienen Q₁₀. En general, las NPs generadas fueron grandes aun estando en la escala nanométrica. Por otra parte, la polidispersidad que presentaron fue menor de 0,5 por lo tanto las NPs de las diferentes muestras son homogéneas.

Nanopartículas	Polidispersidad
Vacías	0,12
Q ₁₀	0,46
Ru	0,11
Q ₁₀ /Ru	0,16

Tabla 1 Grado de polidispersidad

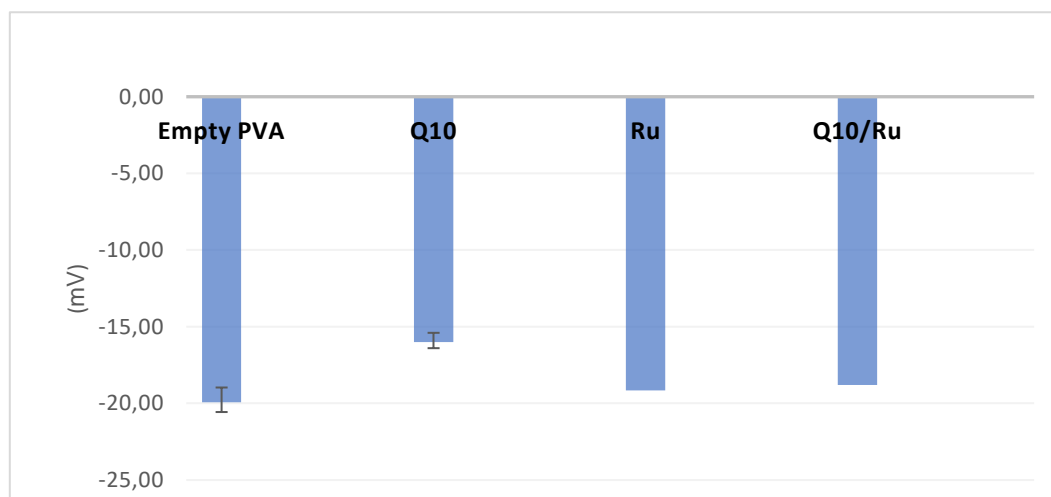
El potencial zeta es la forma abreviada de denominar al potencial electrocinético de los sistemas coloidales. Generalmente se la representa utilizando la letra griega zeta, de ahí se deriva el ζ -potencial. Este se trata de la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido anexa a la partícula dispersada. (Moulden, 2018)



Esquema 6 Potencial Zeta

Diferencia de potencial como una función de la distancia desde la superficie de una partícula suspendida en un medio de suspensión. Referencia: Moulden, A. (2018) 'El potencial Zeta y la química coloidal', pp. 4–6. En línea. Consultada el 02 de enero de 2020. Disponible en: <https://seryactuar.files.wordpress.com/2018/05/a-3-el-potencial-zeta-y-la-quc3admica-coloidal.pdf>.

Así pues, se trata de una herramienta para poder comprender el estado de la superficie de la nanopartícula y predecir la estabilidad a largo plazo. Las nanopartículas con valores potenciales superiores a +25 mV o inferiores a -25 mV, tienen altos grados de estabilidad.



Gráfica 2 Potencial Zeta de las nanopartículas

Como se puede ver en la gráfica 2, el potencial zeta de las NPs de las distintas muestras se encuentra entre -15 mV y -20 mV. Así pues, este ensayo muestra que no se puede considerar que tengan una alta estabilidad, aun así, las nanopartículas son estables a largo tiempo, ya que no precipitan ni forman agregados. La estabilidad de las NPs no solo depende de las fuerzas

electroestáticas, hay otro tipo de fuerzas de tipo estérico que participan en la estabilidad de las NPs y dependen del tipo de surfactante utilizado.



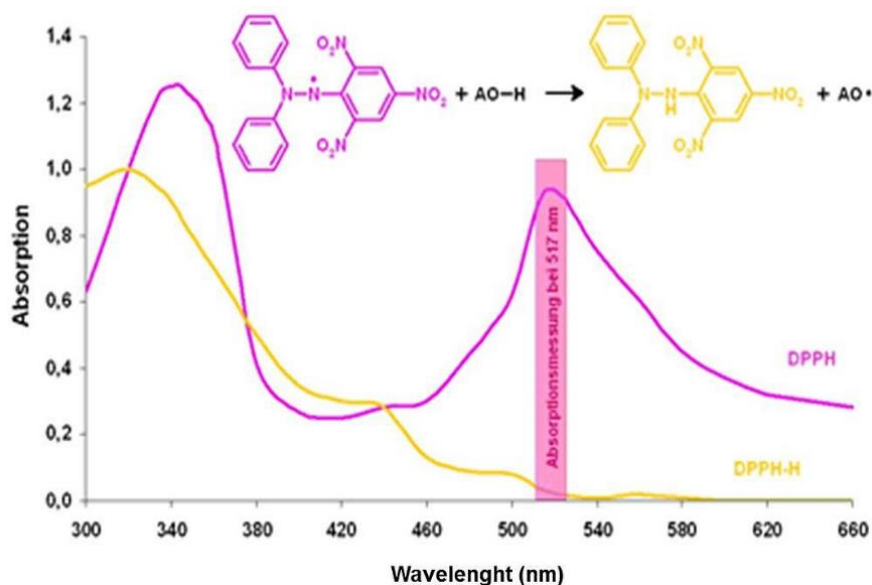
Esquema 7 Estabilidad e inestabilidad de un coloide

Ejemplo de un coloide estable y un coloide inestable. Referencia: Moulden, A. (2018) 'El potencial Zeta y la química coloidal', pp. 4–6. En línea. Disponible en: <https://seryactuar.files.wordpress.com/2018/05/a-3-el-potencial-zeta-y-la-quc3admica-coloidal.pdf>.

6.2.3. Actividad antioxidante (DPPH)

La evaluación de capacidad antioxidante de las nanopartículas se realizó a través del ensayo de actividad antioxidante con el radical DPPH y del ensayo de actividad antioxidante a nivel celular y de ADN. El método que se basa en el bloqueo del radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (**DPPH**) fue el primero en realizarse. De esta forma se determinaron las concentraciones de muestra con actividad antioxidante y a base de este, se utilizaron las mismas concentraciones en los ensayos posteriores.

DPPH es un radical químico orgánico. Este ensayo se basa en su estabilidad, que dependerá de la deslocalización del electrón desapareado. Este electrón da una absorción máxima a 517 nm, y al estar deslocalizado, tiene un color lila en una solución con etanol. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o entra en contacto con otra especie radical, el color cambia de lila a amarillo a medida que la absorción molar del radical DPPH se reduce. Esto se produce a causa del electrón, que se empareja con el átomo de hidrógeno de un antioxidante que atrapa los radicales libres. De esta forma, se produce la forma reducida DPPH-R (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) variando el valor de la absorbancia y siendo esta diferencia de absorbancias la que nos indicó la actividad antioxidante de las muestras. (Dureja and Dhiman 2012; Garlick, Courtice, and Munoz Marcus 1965; Jiménez Monreal, Sánchez Manzanera, and Martínez Tomé 2012)



Gráfica 3 Cambio de absorbancia en la reducción del radical DPPH

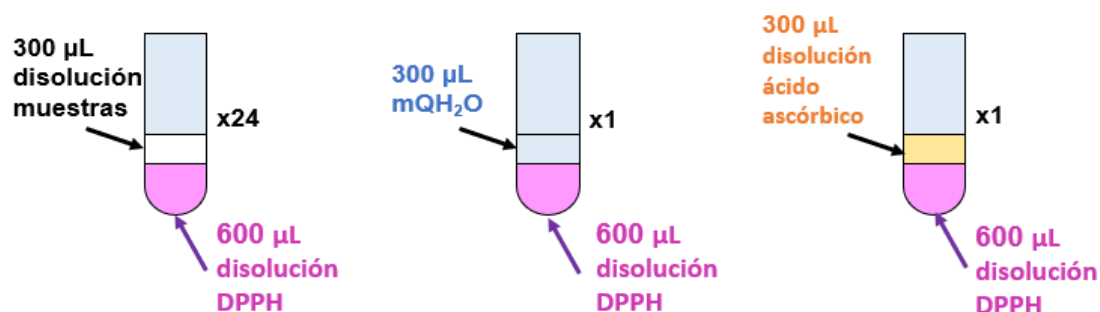
Gráfico que muestra el cambio de color de la DPPH de lila a amarillo cuando se expone a una sustancia antioxidante. Referencia: Mendoza Pérez, Jorge Albero, Fregoso Aguilar, Tomás Alejandro (2013) "Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A Role for Antioxidants" *Chemistry of Natural Antioxidants and Stues Performed with different Plants Collected in Mexico*. 20577252247. En línea. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/chemistry-of-natural-antioxidants-and-studies-performed-with-different-plants-collected-in-mexico> Consultado el 09 de diciembre de 2019.

Para la realización del ensayo, se preparó, en primer lugar, una solución de DPPH en etanol con una concentración final de 60 μM . Después se prepararon los controles del ensayo para así comparar los resultados de las muestras; el control con ácido ascórbico (Vitamina C), un potente antioxidante ya que se trata de un donante de electrones, y el control con mQH_2O , el cual no muestra actividad antioxidante alguna. Así pues, el control de ácido ascórbico se preparó para una concentración final de 0,01 mg/mL en mQH_2O . Se debe tener en cuenta, que la solución de DPPH debe estar envuelta en papel de aluminio en todo momento, puesto que el radical es sensible a la luz y podría romperse, afectando a los resultados.

Una vez se obtuvo la solución de DPPH en etanol (60 μM) y los controles de mQH_2O y ácido ascórbico (0,01 mg/mL), se prepararon las muestras a una concentración final desde 33,3 % hasta 1,04 % (v/v) en mQH_2O .

En primer lugar, las muestras con SLN vacías con PVA, con el activo Q_{10} , con el activo Ru y con ambos activos Q_{10}/Ru , se sonicaron en el equipo de baño de ultrasonido (explicado en la sección 6.1.1.), es decir, se aplicó la energía del ultrasonido para disgregar las partículas, durante 20 minutos. Después, se prepararon disoluciones de estas muestras en mQH_2O de: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 % (v/v). Obteniendo así un total de 6 disoluciones distintas para cada muestra; 24 disoluciones en total. Finalmente, 300 μL de cada

disolución de la muestra se mezclaron con 600 μL de la disolución de DPPH. Lo mismo para los controles. Teniendo un total de 26 muestras; 24 disoluciones con las muestras y los 2 controles.



Esquema 8 Muestras de ensayo en actividad antioxidante (DPPH)



Figura 19 Controles en actividad antioxidante (DPPH)

De izquierda a derecha: Control con mQH_2O y Control con ácido ascórbico.

A la hora de preparar los controles con mQH_2O y con ácido ascórbico, se pudo comprobar de forma visual, tal y como se muestra en la figura 19, que el ácido ascórbico reduce el DPPH, produciendo así el cambio de color. En cambio, el mQH_2O no reacciona con el DPPH quedándose de color lila.

Las 26 muestras se agitaron en una incubadora a temperatura ambiente (explicada en sección 6.1.1.). Esta incubadora se utilizó porque, al estar tapada, previene la reducción del DPPH de forma espontánea. Se observa como a medida que pasa el tiempo, el color de las muestras va cambiando de lila a amarillo en la tabla 2.







Tiempo en incubadora					
1h	3h	24h	1h	3h	24h
					
Muestras con una concentración de 50 % en Ru			Muestras con una concentración de 12,5 % en Q₁₀/Ru		

Tabla 2 Cambio de color de las muestras Ru y Q₁₀/Ru. Con concentraciones del 50 % y 12,5 %, respectivamente, por efecto del radical DPPH

Una vez pasadas 24 h en la incubadora, las muestras se colocaron en la centrifugadora para hacer precipitar los restos de las NPs y así no influir en la lectura de la absorbancia. Como se puede ver, las muestras antes de centrifugar (Tabla 2), se ven más turbias que en la figura 20, después de precipitar las NPs.

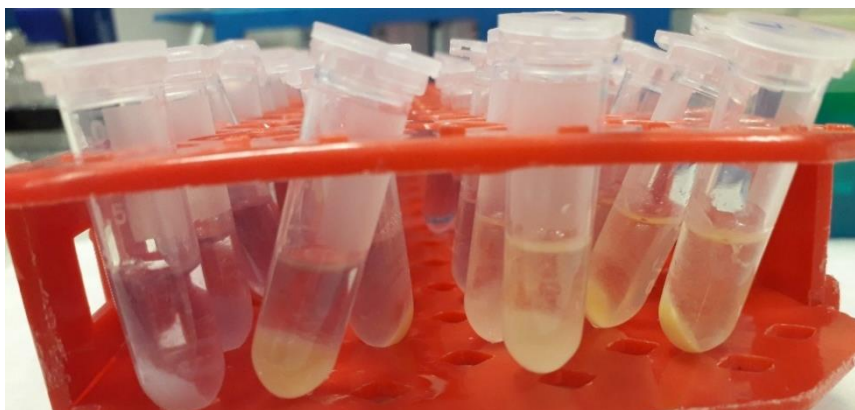


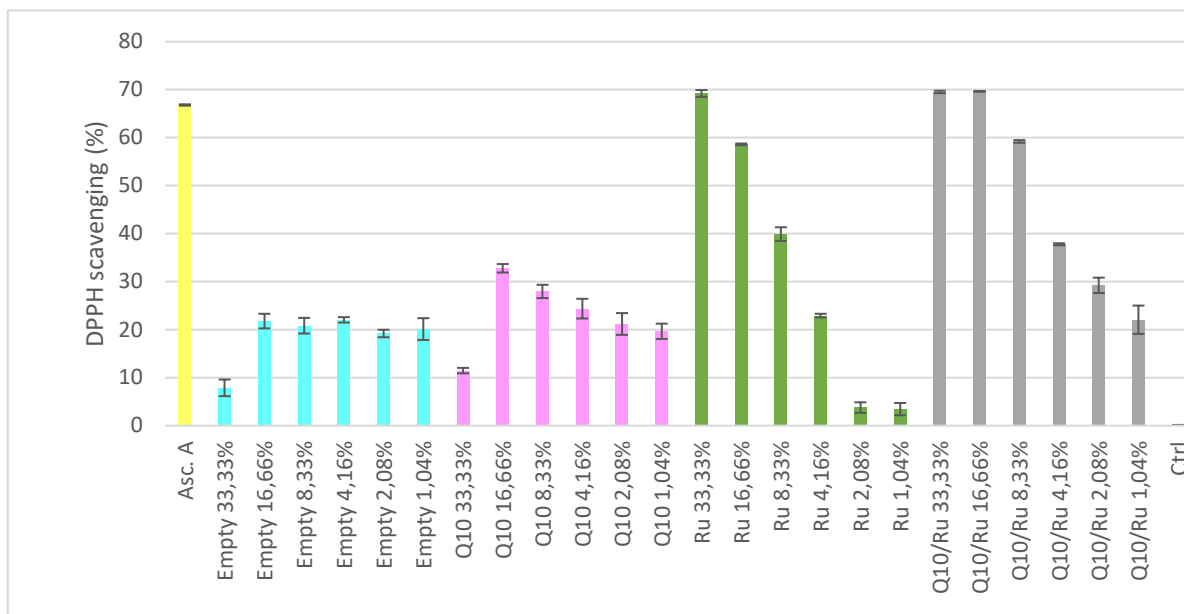
Figura 20 Muestras después de centrifugar

La capacidad que tienen las muestras de atrapar los radicales libres determinó su actividad antioxidante. Para poder hacerlo, se midieron los valores de absorbancia de las muestras a una $\lambda = 517$ nm en Infinite M200 multipwell plate reader (Tecan) (explicado en sección 6.1.1). La capacidad de atrapar radicales libres se calculó con la siguiente formula:

$$\left(1 - \left(\frac{S_{abs}}{Ctrl_{abs}}\right)\right) \cdot 100,$$

Ecuación 1 Actividad antioxidante (%)

Donde, S_{abs} representa la absorbancia de las distintas muestras y ácido ascórbico, y $Ctrl_{abs}$ la absorbancia del control del DPPH en mQH_2O .



Gráfica 4 Actividad antioxidante a través de la capacidad de atrapar radicales libres utilizando DPPH

Como se puede ver en la gráfica 4, la capacidad de atrapar radicales libres de las distintas muestras las compararemos con la del ácido ascórbico y las del control. En primer lugar, las NPs vacías de PVA, no muestran gran capacidad antioxidante. Las NPs con Q_{10} o con Ru, muestran actividad antioxidante siendo las NPs con Ru las que tienen mayor actividad en las concentraciones de 33,33 % y 16,66 %, obteniendo valores similares al ácido ascórbico.

Los resultados correspondientes a las nanopartículas que contienen los dos activos (Q_{10} y Ru), muestran la mayor actividad antioxidante, demostrando así que los dos activos en conjunto tienen mayor capacidad de atrapar radicales libres que por separado. Como se ha comentado antes, la actividad antioxidante para las NPs con Ru era muy alta para las concentraciones de 33,33 % y 16,66 %. En el caso de estar en conjunto con Q_{10} , la actividad antioxidante es alta para esas concentraciones, pero también en concentraciones inferiores como **8,33 %**, **4,16 %** y **2,08 %**.

El ensayo se repitió para poder confirmar los resultados. Los resultados del ensayo repetido se encuentran en la sección B.1 del Anexo B.

6.2.4. Inhibición de la elastasa y colagenasa

El colágeno es una proteína esencial que está presente en todo nuestro cuerpo. Su función cutánea es darle a la piel fuerza y estructura, además de ser un soporte interno. Es el responsable de que la piel se mantenga firme y elástica. Con la edad, se genera menos colágeno y de peor calidad, de esta forma aparece la flacidez en la piel. La elastina, a diferencia del colágeno confiere más elasticidad que resistencia. Ésta forma parte del tejido conjuntivo de la piel formando fibras y manteniendo la piel firme y con buen aspecto. Aunque no sea tan abundante como el colágeno, hace que la piel se vea más joven. Pero de la misma forma, con los años se reduce su producción y su calidad, de esta forma aparecen las arrugas. (Escobar and Aristizábal 2010)

La elastasa y colagenasa son dos enzimas que degradan las fibras elásticas y rompen los enlaces del colágeno, respectivamente. Así pues, estas dos enzimas son las responsables de la aparición de las arrugas y flacidez. (Escobar M & Aristizábal G, 2010)

Para determinar la inhibición que presentan las muestras generadas a estas dos enzimas, se prepararon en primer lugar, para la inhibición de elastasa, el 10X reaction buffer [1M Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM sodium azide] a una concentración de 1X. Para la inhibición de colagenasa se hizo lo mismo, pero con el 10X reaction buffer [0,5M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 50 mM CaCl₂, 2 mM sodium azide, pH 7.6].

En segundo lugar, para la inhibición de la elastasa, la enzima se diluyó en el buffer 1X preparado anteriormente de forma que la concentración final fue de 0,2 U/mL. En el caso de la inhibición a la colagenasa, la enzima se diluyó en su correspondiente buffer 1X de forma que la concentración final fue de 0,5 U/mL.

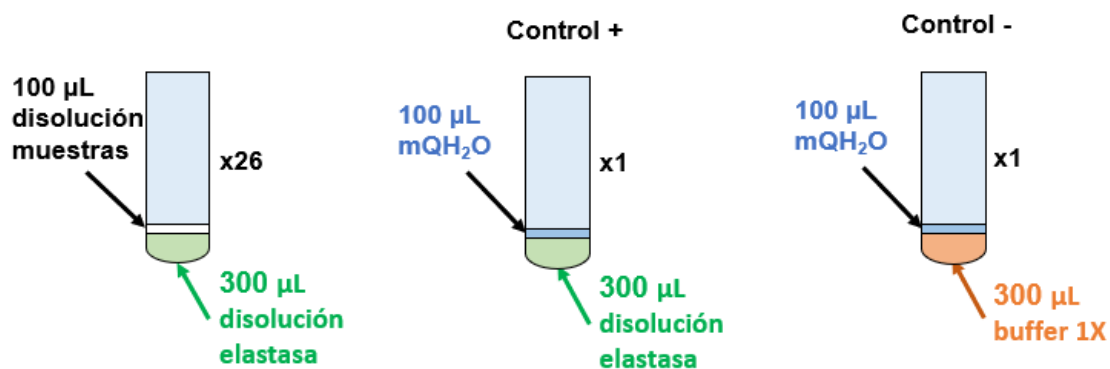
Después, se prepararon los controles positivo y negativo de estos ensayos, donde el control positivo contenía la enzima (300 µL de la disolución de la enzima y 100 µL de mQH₂O) y el control negativo se preparó sin la enzima (300 µL de buffer 1X en cada caso y 100 µL de mQH₂O).

Una vez se obtuvo la solución de elastasa (0,2 U/mL), colagenasa (0,5 U/mL) y los controles positivo y negativo en los dos casos, se prepararon las muestras en cada caso.

Elastasa

Las muestras de NPs vacías con PVA, NPs con Q₁₀, NPs con Ru y NPs con Q₁₀/Ru, se disgregaron mediante sonicación y se prepararon disoluciones de estas muestras en mQH₂O de: 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,56% y

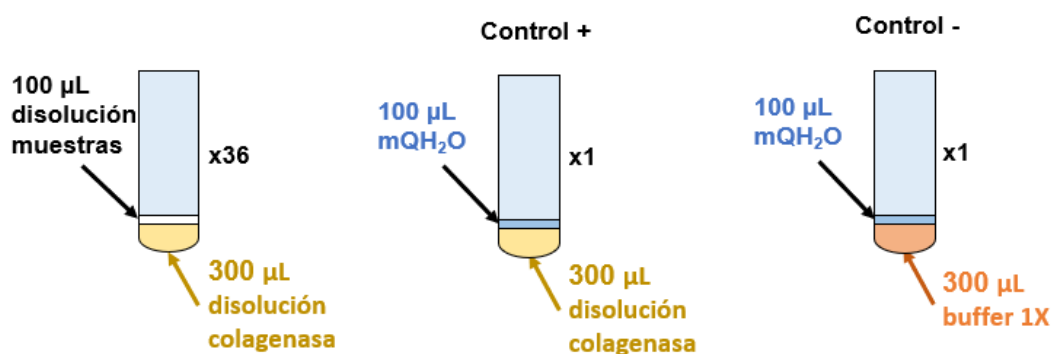
0,78 % (v/v). Obteniendo así un total de 7 disoluciones distintas para cada muestra; 28 disoluciones en total. Finalmente, se prepararon 100 μ L de cada disolución de la muestra, en 300 μ L de la disolución elastasa. Teniendo un total de 30 muestras; 28 disoluciones con las muestras, el control positivo y el control negativo.



Esquema 9 Muestras de ensayo en inhibición a la elastasa

Colagenasa

De la misma forma que en las muestras de elastasa, en este caso, después de sonicar las muestras para disgregarlas, se prepararon 9 disoluciones de estas muestras en mQH₂O de: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,56 % y 0,78 %, 0,39 % (v/v). 36 disoluciones en total. Finalmente, se prepararon 100 μ L de cada disolución de la muestra, en 300 μ L de la disolución de colagenasa. Teniendo un total de 38 muestras; 36 disoluciones con las muestras, el control positivo y el control negativo.



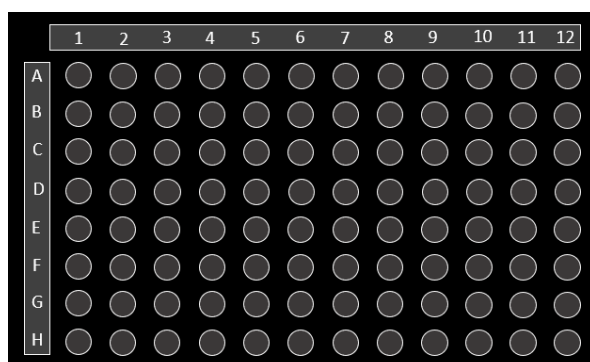
Esquema 10 Muestras de ensayo en inhibición a la colagenasa

Una vez preparadas todas las muestras, se incubaron por 24 h a temperatura ambiente y una vez pasado ese tiempo se centrifugaron para hacer precipitar las NPs y no influyeran en la lectura de la fluorescencia.

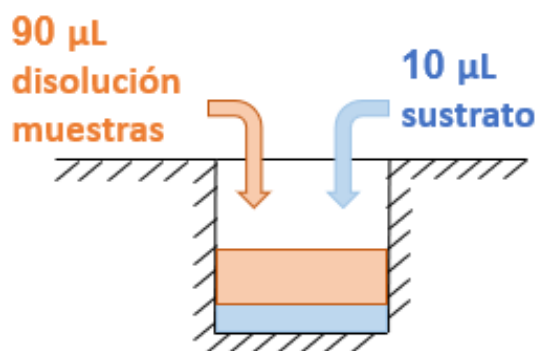
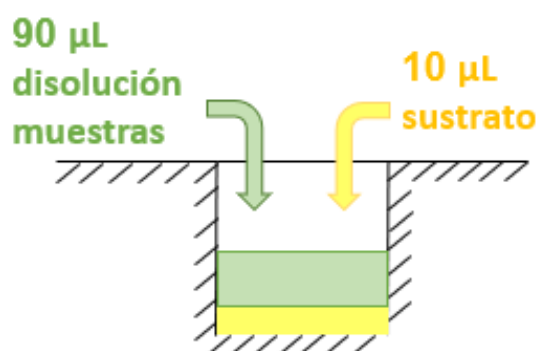
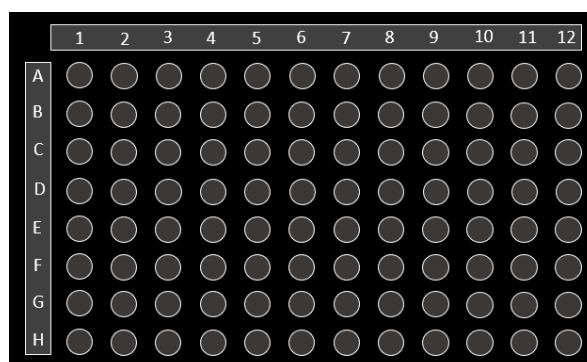
Finalmente, se preparó el sustrato donde actuaron las enzimas a inhibir. En el caso de la elastasa se preparó una elastina conjugada a un fluoróforo (BODIPY FL) a una concentración de 100 µg/mL. En el caso de la colagenasa se preparó la gelatina conjugada a un fluoróforo (fluoresceína) a la misma concentración de 100 µg/mL.

Teniendo el sustrato preparado, se prepararon las placas. Las placas utilizadas en este caso fueron de 96 pozos igual que las del ensayo del radical DPPH, pero de color negro, para evitar influencia de la fluorescencia de los pozos contiguos. Así pues, se colocaron directamente en los pozos de la placa 90 µL de cada una de las distintas disoluciones de muestras y 10 µL del sustrato correspondiente.

Placa para inhibición de elastasa



Placa para inhibición de colagenasa



Esquema 11 Placas para ensayo de inhibición de las enzimas elastasa y colagenasa

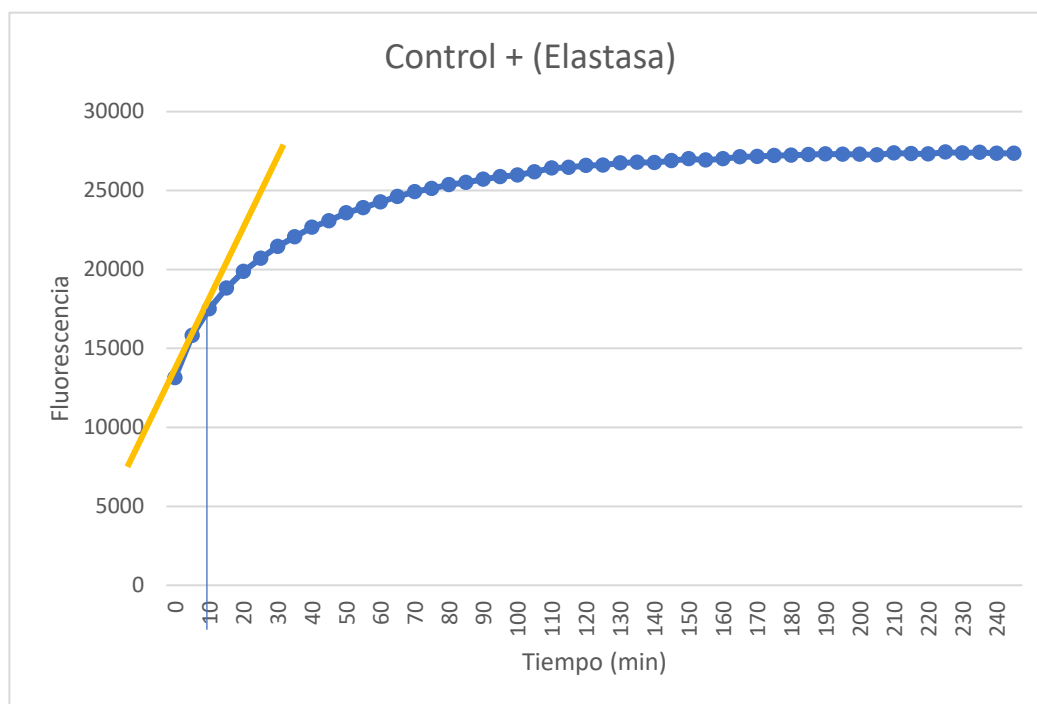
La capacidad que tienen las muestras de inhibir la elastasa se obtiene midiendo la fluorescencia a una $\lambda = 530$ nm utilizando Infinite M200 multiwell plate reader (Tecan). La inhibición a la elastasa y colagenasa se presenta en porcentaje y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(1 - \left(\frac{SF_{final} - SF_{inicial}}{(CtrlF_{final} - CtrlF_{inicial})} \right) \right) \cdot 100$$

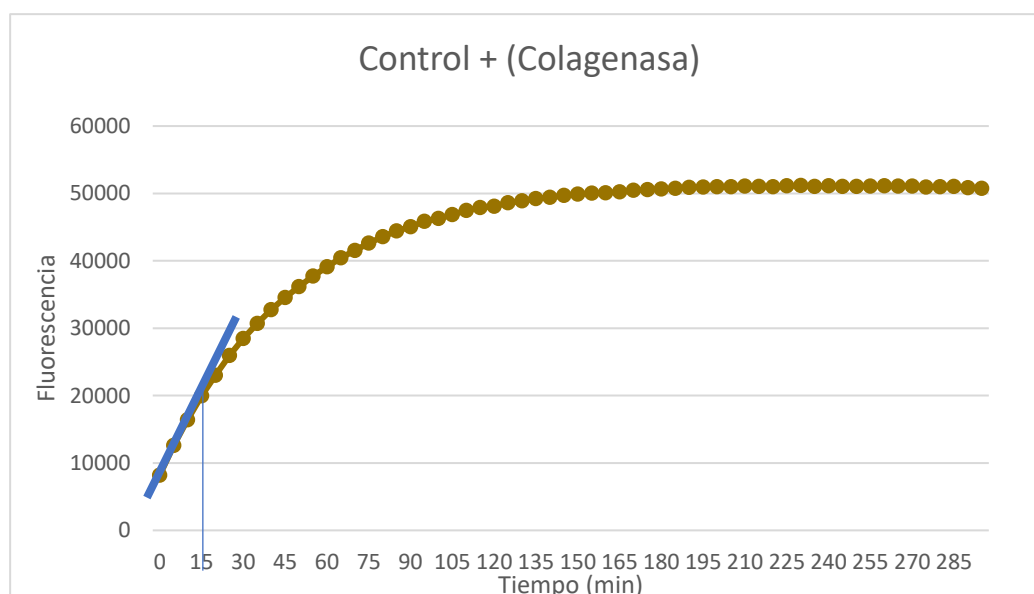
Ecuación 2 Inhibición a las enzimas elastasa y colagenasa (%)

Donde, SF representa la fluorescencia de las distintas muestras al inicio de la reacción (SF_{inicial}) y al final de la reacción (SF_{final}), y CtrlF la fluorescencia del control positivo al inicio de la reacción ($\text{CtrlF}_{\text{inicial}}$) y al final de la reacción ($\text{CtrlF}_{\text{final}}$).

El valor inicial corresponde al minuto 0 y el valor final al último minuto en el que la curva pierde la linealidad. En el caso de la elastasa la linealidad se perdió en el minuto 10 y en el caso de la colagenasa en el minuto 15.

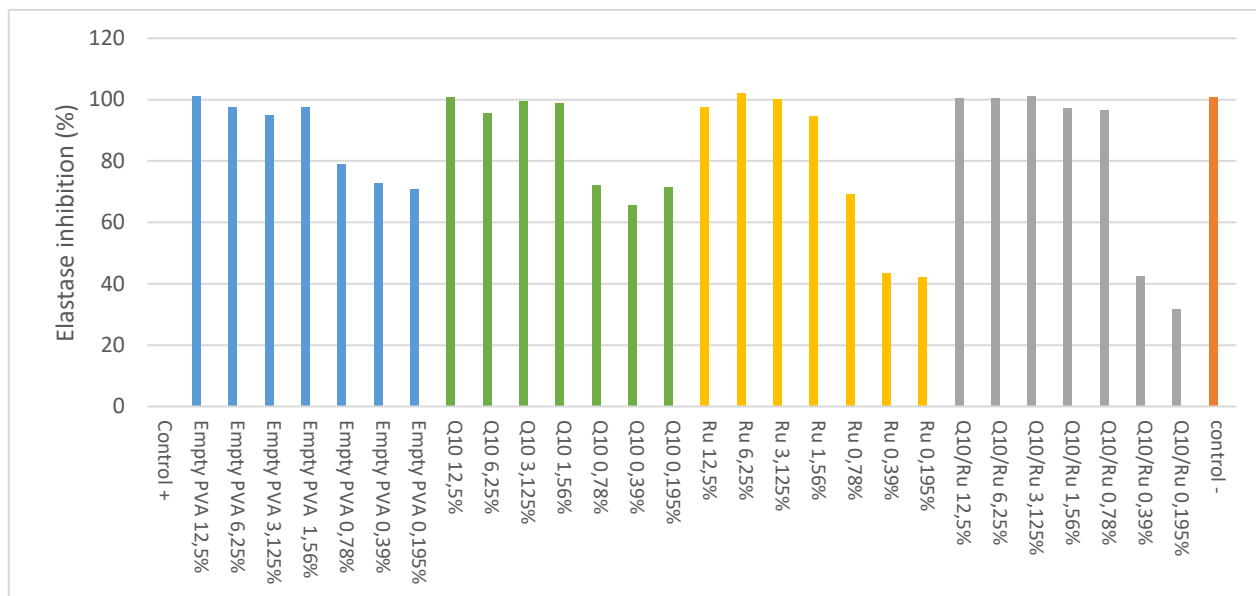


Gráfica 5 Fluorescencia del control positivo en ensayo de inhibición a la elastasa

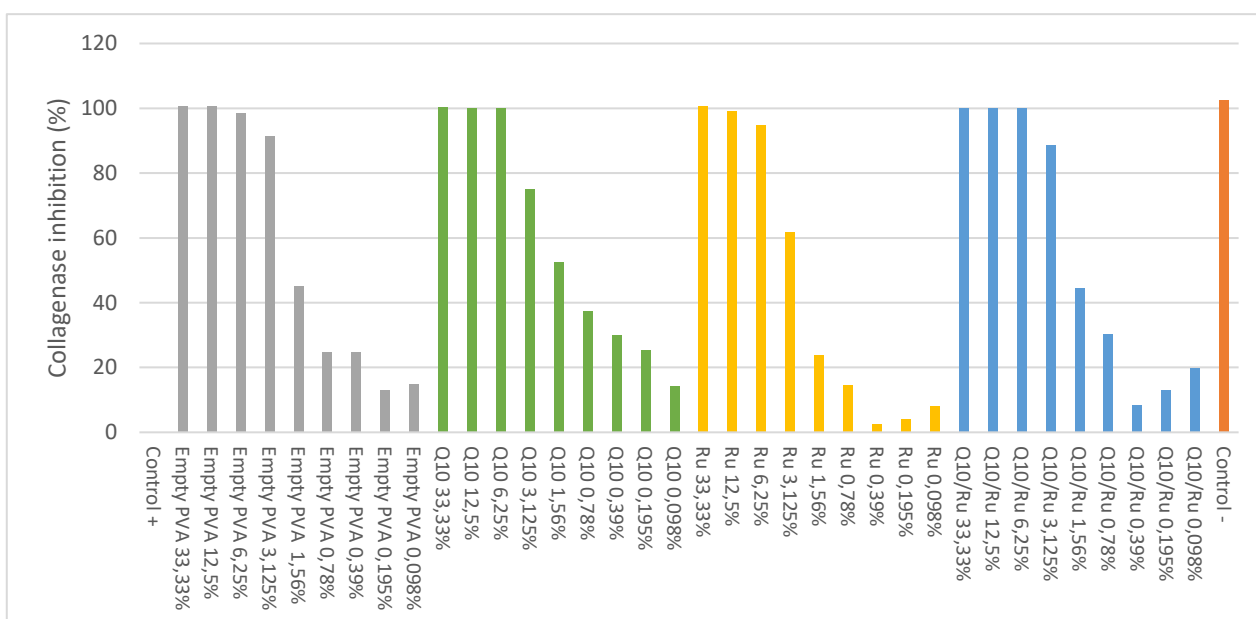


Gráfica 6 Fluorescencia del control positivo en ensayo de inhibición a la colagenasa

Teniendo los valores inicial y final para cada ensayo, se calculó la inhibición de las enzimas.



Gràfica 7 Inhibició a la elastasa



Gràfica 8 Inhibició a la colagenasa

Como se puede observar en las gráficas 7 y 8, las NPs vacías (Empty PVA) ya presentan inhibición, sugiriendo que los resultados que obtenemos pueden ser causados por un problema artefactual o por la posible interacción entre las NPs y el fluoróforo. Por tanto, este ensayo, para las SLN generadas en este estudio, no puede tenerse en cuenta a la hora de valorar si los activos Q₁₀ y Ru pueden inhibir a la elastasa y a la colagenasa.

En la sección B.2 del Anexo B se encuentran los resultados de la repetición de ambos ensayos para poder comprobarlo.

6.2.5. Ensayos a nivel celular

Los ensayos realizados a continuación son a nivel celular, de esta forma es más similar al entorno al que se quiere aplicar. Este trabajo incluye el ensayo de biocompatibilidad de las muestras, la actividad antioxidante en las células y la protección de éstas ante los rayos UV. Para poder realizarlos, en primer lugar, se prepararon las células en relación a los diferentes ensayos. Las placas que se utilizaron en los ensayos a nivel celular son placas de 96 pozos de poliestireno de cultivo tisular tratado y todos se realizaron dentro de una cabina de seguridad biológica (explicada en la sección 6.1.1.) para no contaminar las células.

Las células utilizadas son fibroblastos humanos (ATCC-CRT-4001, BJ-5ta) y queratinocitos (línea celular HaCat). Estas células se encontraban en placas de Petri adheridas en el sustrato en el que estaban sembradas.

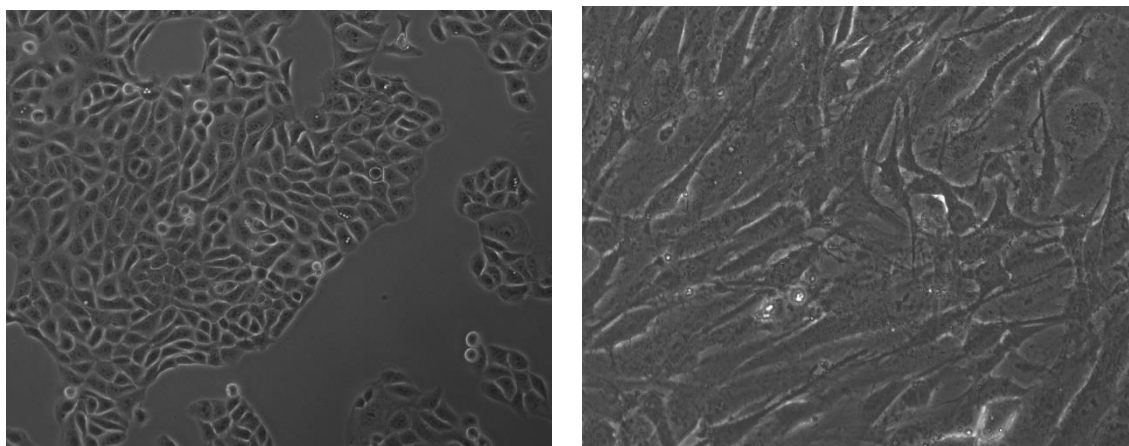


Figura 21 Células HaCat y células BJ5ta

De izquierda a derecha: Células HaCat fotografiadas a 10X de aumento. Células BJ5ta fotografiadas a 20X de aumento.

Para poder utilizar estas células, se aspiró el medio (DMEM) en el que se encontraban estas células y se lavó con PBS para eliminar los restos que queden de suero en las células. Se añadió entonces 2 mL de tripsina en las placas y las células se incubaron durante 12 minutos 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % CO₂. La tripsina permitió que las células se despegasen de la superficie de la placa.

Pasado el tiempo de incubación, se añadió 5 mL de medio en las placas incubadas. El medio inactiva la tripsina al contener suero bovino. A continuación, se retiró el contenido de las placas, se pusieron en un tubo (*falcon*) de 15 mL y se centrifugaron durante 5 minutos a 150 g para hacer precipitar a las células.

El siguiente paso fue aspirar el sobrante del *falcon* y resuspender las células precipitadas con medio mediante pipeteo por arrastre. Así pues, las células ya estuvieron listas para ser utilizadas en los ensayos.

Para el ensayo de biocompatibilidad se necesita preparar placas de 96 pozos que contengan 60.000 células por pozo y para el ensayo de actividad antioxidante que contengan 30.000 células por pozo. Para poder tener aproximadamente esta cantidad, debemos saber la concentración de células en mililitros de medio. Así pues, de los *falcon* obtenidos con las células HaCat y BJ5ta anteriormente, se inyectaron 10 µL en una cámara Neubauer. Esta cámara permite contar las células a través de las divisiones que presenta tal y como se muestra en la figura 22.

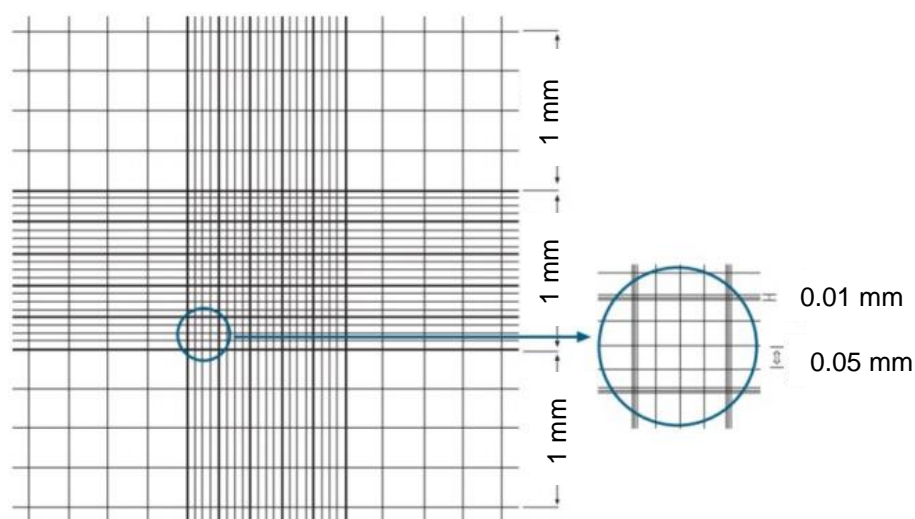


Figura 22 Cuadrícula de cámara Neubauer

Cuadrícula de cámara Neubauer dimensiones de cuadrícula: 0,01. Referencia: QuercusLab. Cámara de Neubauer CE. En línea. Consultada el 20 de diciembre de 2019. Disponible en: <https://quercuslab.es/recuento-celular/940-camara-de-neubauer-ce.html>.

A través de un microscopio (explicado en la sección 6.1.1) se contaron las células en las cuadrículas. Una vez hecho, el recuento de las células se multiplicó por el número 10.000. Este número se refiere a la inversa del volumen total de todos los cuadros donde se hizo el recuento. El volumen de un solo cuadro es de 0,0001 cm³, puesto que las dimensiones son 0,1 cm x 0,1 cm y la profundidad es de 0,01 cm.

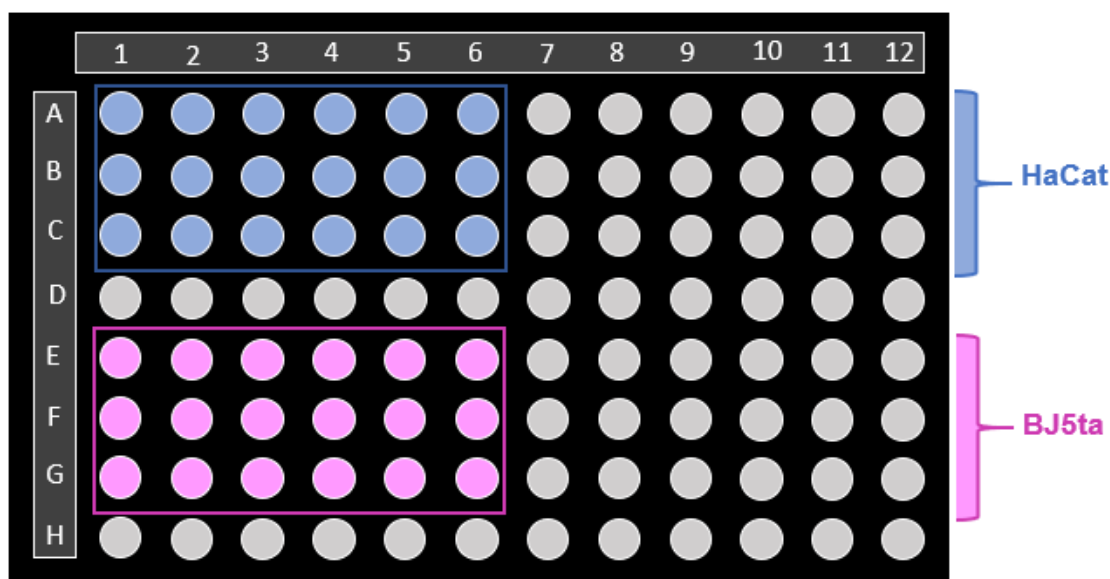
$$0,1 \text{ cm} \cdot 0,1 \text{ cm} \cdot 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ mL}$$

Al multiplicar las células por la inversa del volumen se obtuvo la concentración [células/mL] de los *falcon* preparados con las células HaCat y BJ5ta, de esta forma se pudo calcular la cantidad de células que se debían añadir posteriormente en cada ensayo. Estos cálculos se encuentran detallados en la sección C.1. del Anexo C.

6.2.5.1. Biocompatibilidad

El ensayo de biocompatibilidad de las SLN muestra si éstas tienen efecto en las células, de esta forma se obtuvo la concentración de las muestras preparadas que se debía utilizar en los posteriores ensayos.

En primer lugar, se preparó la placa de 96 pozos de poliestireno de cultivo tisular tratado con una densidad en cada pozo de 60.000 células por pozo tal y como se encuentra calculado en la sección C.2. del Anexo C. Obteniendo así la placa del esquema 12.



Esquema 12 Placa de ensayo de biocompatibilidad

Esta placa se incubó por 24 horas a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % en CO₂. Pasado este tiempo, se aspiró el medio en el que encontraban las células y se añadieron las SLN vacías, con Q₁₀, con Ru y con Q₁₀/Ru. La concentración utilizada fue del 2,08 % (v/v) de muestra. Esta concentración se obtuvo a través de un ensayo de biocompatibilidad realizado con distintas concentraciones y en la que mostraba biocompatibilidad a partir de 4,16 %. Se realizó un ensayo para distintas concentraciones y para los valores de 4,16 % y 2,08 %, tal y como se muestra en el Anexo D.

Así pues, se preparó la concentración 2,08 % para las distintas muestras de SLN y un control que contenía únicamente el medio DMEM. Una vez preparadas se pipetearon 100 µL de las muestras y de control en la placa para ponerlas en contacto con las células. A continuación, fueron incubadas durante 2 h a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % CO₂. Pasadas las dos horas, se aspiró el contenido de los pozos y se lavó con 200 µL de PBS para eliminar restos de medio.

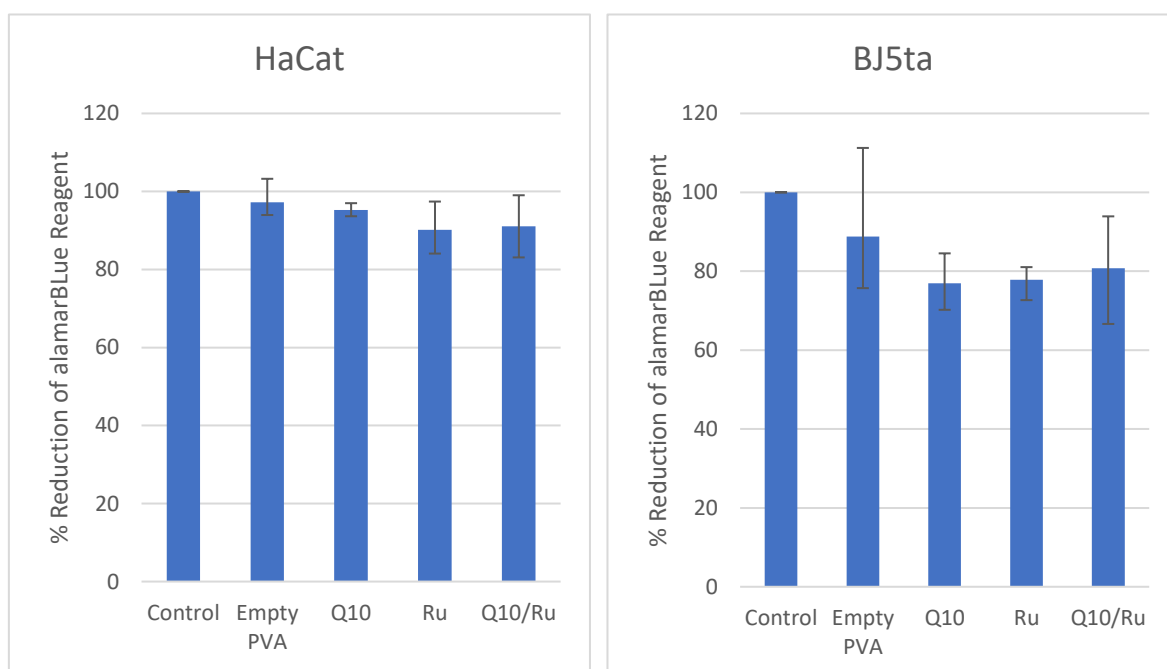
Se preparó entonces el reactivo de viabilidad celular resazurina o AlamarBlue y se añadieron 100 µL en los pozos. Este colorante (azul no fluorescente) se reduce en resorufina (rosado y fluorescente), proceso que se asocia principalmente con la mitocondria de células vivas (Escobar M & Aristizábal G, 2010) Así pues, cuando se incuba con células viables, el reactivo cambia de color y se vuelve fluorescente.

La resazurina se dejó en contacto con las células durante 4 horas a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % CO₂. Y se leyeron los valores de fluorescencia en Infinite M200 multiwell plate reader (Tecan). El porcentaje de reducción del reactivo AlamarBlue es directamente proporcional a la cantidad de células vivas y se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{ reducción del reactivo AlamarBlue} = \frac{(S_f - \text{NoCells})}{(\text{Ctrl} - \text{NoCells})} \cdot 100$$

Ecuación 3 Reducción del reactivo AlamarBlue (%)

Donde S_f es la fluorescencia en los pozos donde se encontraban las células con las SLN a una concentración de 2,08 %, NoCells los pozos donde no se encuentran células y Ctrl, los pozos de control donde las células se encontraban únicamente con el medio.



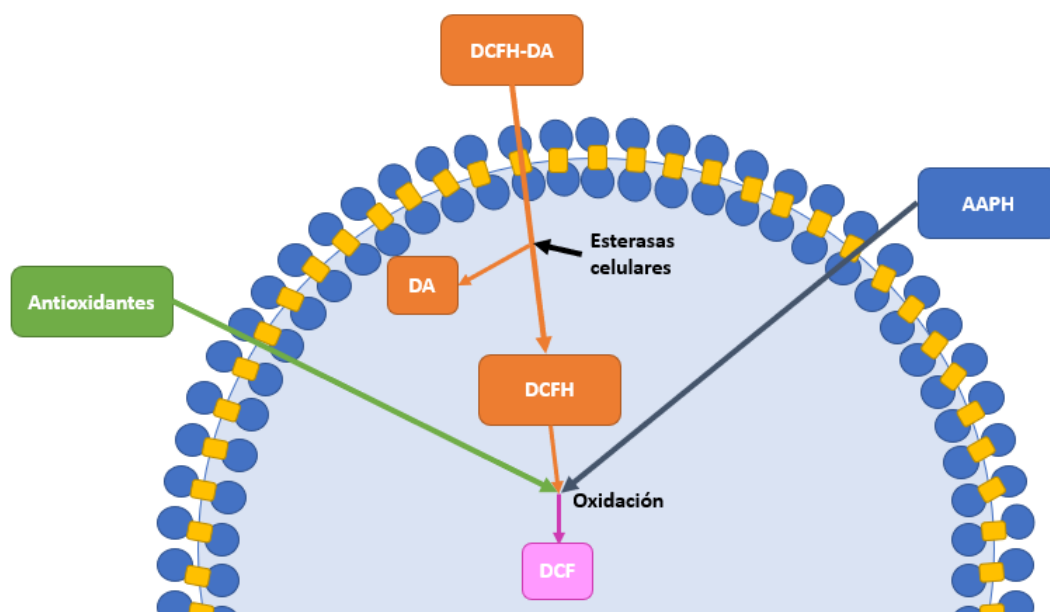
Gráfica 9 Biocompatibilidad con muestras a una concentración del 2,08 % en células HaCat y BJ5ta

Los resultados de la gráfica 9 muestran que las muestras a una concentración de 2,08 % son biocompatibles con las células HaCat y las BJ5ta. Los resultados son expresados como el promedio de tres mediciones para cada una de las muestras y para el control. Estos resultados fueron confirmados (Anexo B).

6.2.5.2. Actividad Antioxidante a nivel Celular (CAA)

En el apartado 6.2.3 se evaluó la capacidad antioxidante de las muestras con el radical químico orgánico DPPH. En este apartado se evaluará la misma actividad, pero a nivel celular. Este método mide el índice de actividad antioxidante celular (**CAA** del inglés *cellular antioxidant activity*) el cual refleja la capacidad de los antioxidantes para reducir el estrés oxidativo intracelular, así como evaluar no solo el potencial de reducción de un determinado compuesto o su capacidad para captar radicales libres, sino factores como la permeabilidad de la membrana celular, captación celular, distribución y metabolismo. (Morales, 2009)

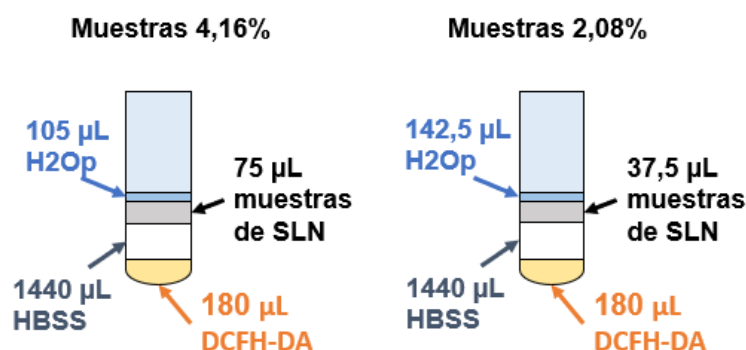
Para evaluar la actividad antioxidante a nivel celular se utiliza **DCFH-DA** (Diacetato de 2', 7' -diclorofluoresceína). Este compuesto tiene la capacidad de ser permeable a las células, después de la difusión, el DCFH-DA es desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente denominado **DCFH** (Diclorofluorescina), el cual después es oxidado por las especies reactivas de hidrógeno, en este caso se utilizó **AAPH** (dihidrocloreuro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (explicado en 6.1.2.), a un compuesto altamente fluorescente, el **DCF** (Diclorofluoresceína). Los antioxidantes impiden la oxidación del DCFH, neutralizando los radicales libres y por lo tanto disminuyendo la fluorescencia. (Morales 2009, Wolfe et al., 2007) Este proceso se encuentra en el esquema 13.



Esquema 13 Proceso de actividad antioxidante a nivel celular

En este ensayo se prepararon las SLN vacías con PVA, con Q₁₀, con Ru y con Q₁₀/Ru, a una concentración de 4,16 % y 2,08 % ya que los resultados de biocompatibilidad muestran viabilidad para concentraciones desde 4,16 % a inferiores. De la misma forma que en el ensayo de actividad antioxidante con el radical DPPH, se preparó un control con ácido ascórbico y un control con H₂O purificada.

Las muestras se prepararon en tubos (*eppendorfs*) de 2 mL, donde se añadieron 180 μ L de DCFH-DA [20 μ M] y 1440 μ L de medio HBSS en todas. Para la muestra de ácido ascórbico se añadieron 180 μ L de este compuesto con una concentración de 150 μ g/mL. Para el control se añadieron 180 μ L de H₂O estéril. Finalmente, para las muestras se añadieron las SLN y H₂O estéril para cada concentración, tal y como se muestra en el esquema 14.



Esquema 14 Muestras de ensayo en concentraciones de 4,16 % y 2,08 % en CAA

Para realizar el ensayo, en primer lugar, se preparó la placa de 96 pozos de poliestireno de cultivo tisular tratado con una densidad en cada pozo de 30.000 células y como se encuentra calculado en la sección C.3 del Anexo C.

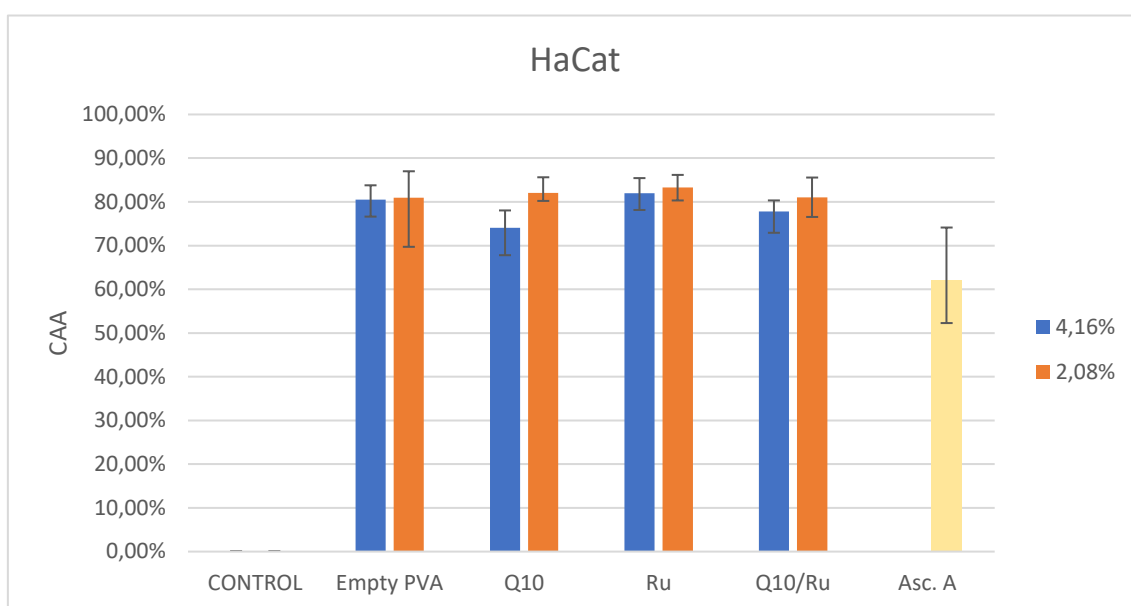
Esta placa se incubó por 24 horas a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % en CO₂. Pasado este tiempo, se aspiró el medio en el que encontraban las células y se lavaron con 200 μ L de PBS cada pozo para eliminar al máximo los restos del medio DMEM y para eliminar todos aquellos componentes que podrían dar resultados artefactuales. Es por eso que en este ensayo se debe utilizar el medio HBSS. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de control (HBSS), de muestras con SLN y muestra con ácido ascórbico de forma que hubiera tres réplicas de cada muestra tanto para las células HaCat como para las células BJ5ta. Se incubaron durante 5 h a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % en CO₂ y pasado este tiempo se aspiró y se lavó con 200 μ L de PBS en cada pozo.

Finalmente, para inducir la oxidación, se añadió 100 µL de AAPH por cada pozo y se leyeron los valores de fluorescencia en Infinite M200 multiwell plate reader (Tecan). La actividad antioxidante a nivel celular (CAA) fue dada por la siguiente fórmula:

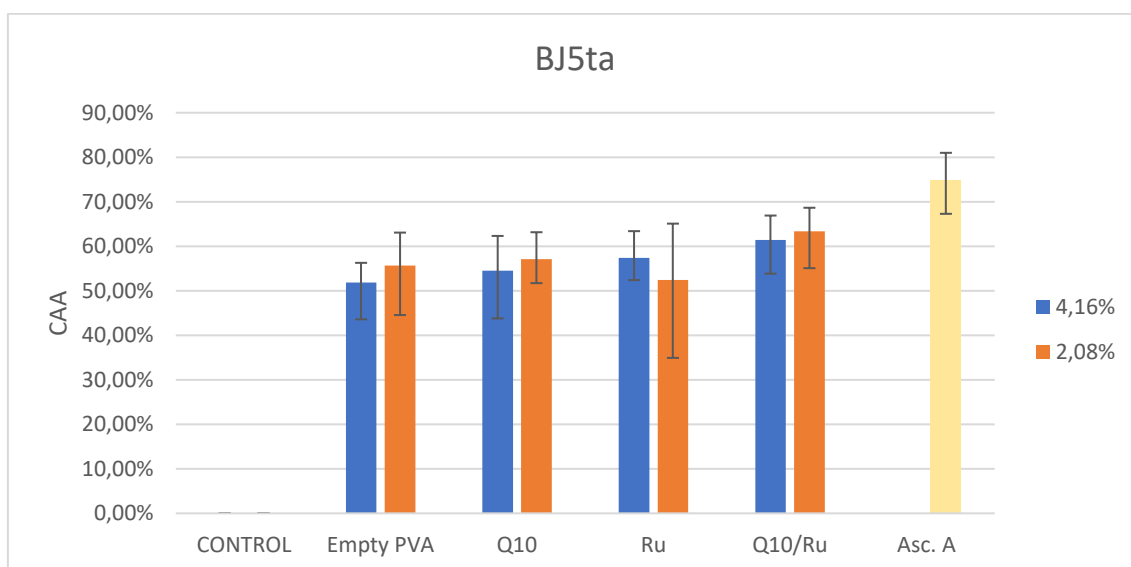
$$CAA \% = \left(1 - \frac{\int SA}{\int CA} \right) \cdot 100$$

Ecuación 4 Actividad antioxidante celular (%)

Donde $\int SA$ es el área integrada bajo la curva de fluorescencia de las muestras y del ácido ascórbico y $\int CA$ es el área integrada bajo la curva de fluorescencia del control.



Gráfica 10 Actividad antioxidante a nivel celular en células HaCat



Gráfica 11 Actividad antioxidante a nivel celular en células BJ5ta

De la misma forma que sucedió en los resultados de la inhibición con elastasa y colagenasa, las NPs vacías (Empty PVA) presentan actividad antioxidante, así pues, los resultados que obtenemos de las otras muestras con los activos de Q₁₀ y Ru, pueden ser causados por la propia composición de las nanopartículas. El ensayo se repitió varias veces para comprobar estos resultados. En el Anexo F se encuentran los resultados del ensayo repetido para concentraciones de 2,08 % y 1,04 %.

6.2.5.3. Reacción de las células HaCat ante luz UV

Para la evaluación de la protección que ofrecen las SLN generadas con los activos de Q₁₀ y Ru, a las células HaCat ante la luz ultravioletada, se utilizó el kit LIVE/DEAD® Viability/cytotoxicity (Invitrogen Molecular Probes, 2005)(Morales, 2009)

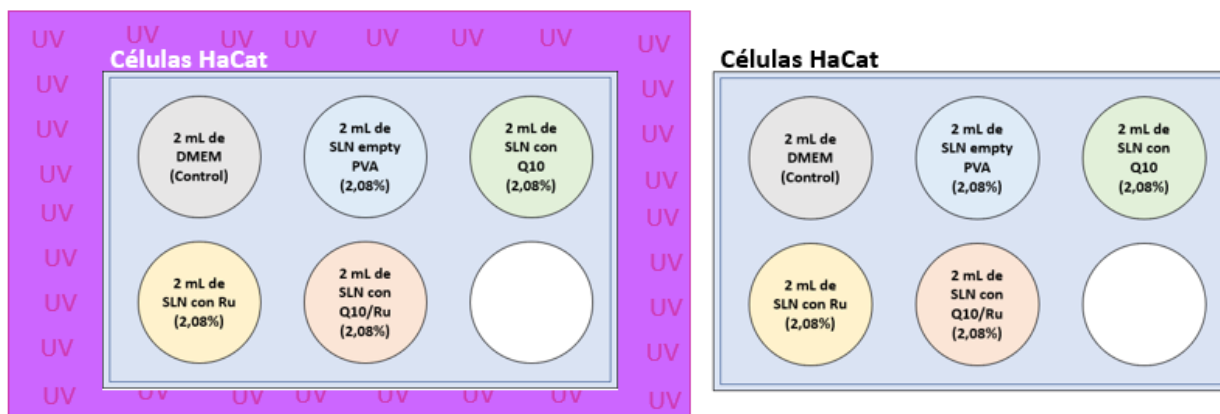
En este ensayo, la viabilidad celular se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas con dos sondas que miden parámetros reconocidos de viabilidad celular: actividad de la esterasa intracelular e integridad de la membrana plasmática. Para poder realizarlo, se utilizaron los colorantes calceína AM y el homodímero de etidio (EthD-1).

Las células vivas se distinguen por la presencia de una actividad de esterasa intracelular, determinada por la conversión enzimática de la calceína AM, no fluorescente, a la calceína intensamente fluorescente. La calceína es un colorante polianiónico que queda retenida dentro de las células vivas, produciendo una fluorescencia verde uniforme e intensa en las células vivas a una longitud de onda de aproximadamente 495 nm~515 nm. Por otra parte, el EthD-1 penetra solo en las células con membranas dañadas experimentando un aumento de hasta 40 veces de su fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos, produciendo así una fluorescencia roja brillante en las células muertas a una longitud de onda de aproximadamente de 495 nm~635 nm.

Así pues, para realizar el ensayo se prepararon 2 placas de 6 pozos. La densidad celular de las placas fue de 300.000 células en cada pozo tal y como se encuentra calculado en la sección C.4 del Anexo C.

Estas placas se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmosfera humedecida de 5 % en CO₂. Pasado este tiempo, se aspiró el medio en el que encontraban las células y se lavaron con 2 mL de PBS en cada pozo. Después se añadieron 2 mL de DMEM en uno de los pozos de cada placa siendo así el control sin tratamiento con el que compararemos las células con NPs. Se prepararon las muestras de SLN vacías, con Q₁₀, con Ru y con Q₁₀/Ru para una concentración

final de 2,08 % y se añadieron 2 mL de cada muestra en los pozos correspondientes. Una vez preparadas las dos placas, una de ellas estuvo sometida a luz ultravioleta y la otra estuvo a temperatura ambiente y envuelta en papel de aluminio, durante 2 h.



Esquema 15 Placas de 6 pozos para ensayo de reacción de células HaCat a los rayos UV

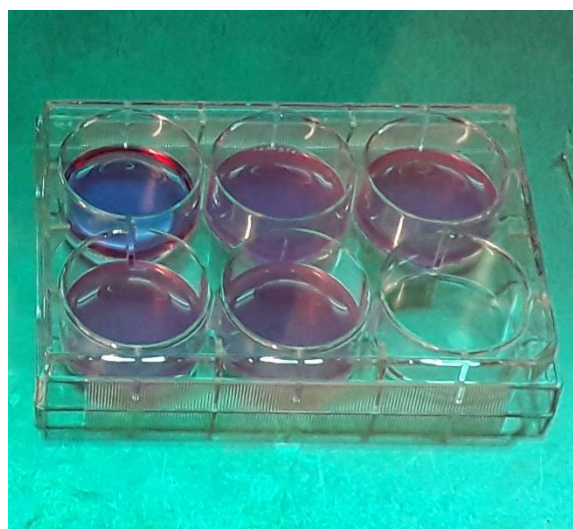


Figura 23 Placa sometida a rayos UV

Pasadas las 2 horas, se aspiró el contenido de los pozos y se lavaron las células con 2 mL de PBS por pozo. Después, se añadieron a cada pozo 500 μ L de una mezcla de 4 μ L de calcein AM y 12 μ L de EthD-1 en 12 mL de PBS y se dejaron las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente envueltas en papel de aluminio. Después se visualizaron en un microscopio (explicado en sección 6.1.1.) con filtro de 590 nm para las células vivas y con filtro de 480 nm para las células muertas.

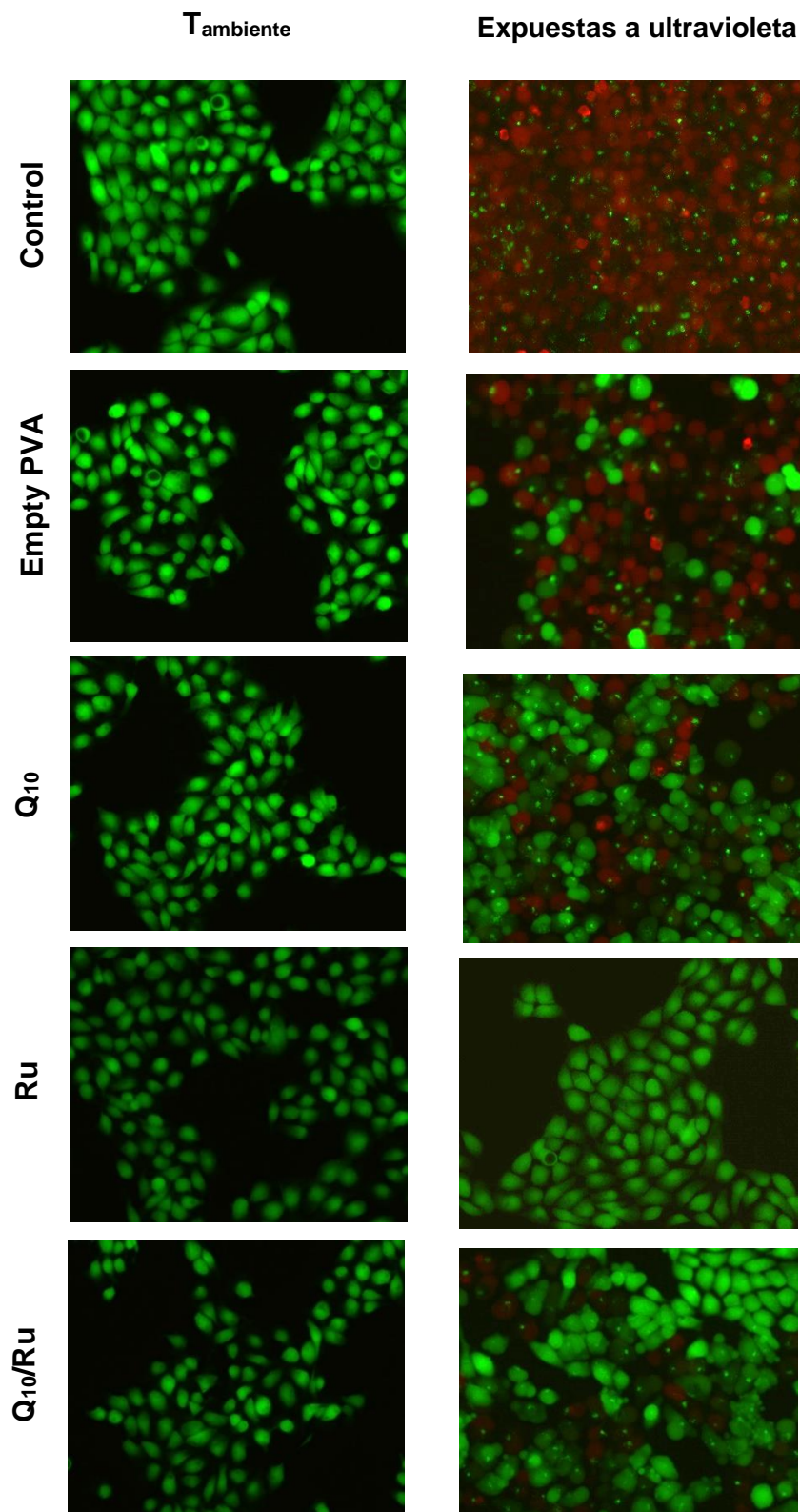


Figura 24 Viabilidad de las células HaCat

En verde se observan las células vivas y en rojo las células muertas. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 10X.

Como se puede observar en la figura 24, las células del control al no tener ningún tipo de protección contra la luz ultravioleta, las células mueren casi en su

totalidad. Por otra parte, las NPs vacías con PVA mostraron cierto efecto protector, que puede ser causado por la composición de la nanopartícula, así como las SLN con los activos Q₁₀ y Ru. Si se comparan los efectos de los activos por separado, se puede observar que en la fotografía de las células tratadas con Q₁₀ y expuestas a la luz UV, hay más células muertas que en la fotografía de las células tratadas con Ru, donde apenas se aprecian células muertas. También, al estar los dos activos juntos presentan más células vivas que en el caso del activo Q₁₀. Por lo tanto, las NPs que contenían el activo Ru presentaron una mayor protección ante la luz ultravioleta

6.2.6. Ensayos con ADN

Actualmente existen varios ensayos que evalúan la capacidad antioxidante, entre ellos se encuentran los realizados en este estudio explicados en la sección 6.2.3 y 6.2.5.2; el ensayo con DPPH y el ensayo de actividad antioxidante a nivel celular, respectivamente. Los ensayos con ADN in vitro son más relevantes a nivel biológico de la misma forma que el ensayo de CAA. En este estudio se realizó el ensayo en ADN oxidado a partir de los RL obtenidos en la reacción de FeSO₄ y H₂O₂. (Leba et al., 2014)

El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas del ADN formándose el radical peroxil. En las células, las posteriores reacciones dan lugar a numerosas modificaciones en las bases del ADN. En consecuencia, cuando tiene lugar la replicación del ADN dañado o cuando el ADN se repara de manera incorrecta, se origina una mutación. Por ello, las lesiones oxidativas del ADN no están implicadas únicamente en el envejecimiento celular, sino que también en enfermedades asociadas a la edad avanzada y el cáncer. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada y esta es excretada por la orina. Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones, estas se acumulan y aumentan con la edad. (Mansego Talavera, 2009)

6.2.6.1. Purificación del ADN

Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN circular capaces de replicarse de forma autónoma, independientemente del genoma celular. Estos se utilizan como vectores para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés y de esta forma amplificarlo de forma natural. Los plásmidos utilizados para este fin deben tener las siguientes características: Tener un origen de replicación autónomo y ofrecer resistencia a un antibiótico. (Caballero et al., 2007)

Se purificó el ADN utilizando el kit de QIA Spin Miniprep. En primer lugar, se añadió el Buffer P1 del kit, para resuspender las células bacterianas y degradar el ARN que se obtendrá después de añadir el buffer P2 y se mezcló invirtiéndolo

10 veces. El buffer P2 se encargó de romper las membranas de las células. Después se añadió el Buffer N3 el cual hizo precipitar los restos de las células y se centrifugó a 18.000 g durante 10 minutos para separar el ADN de los restos celulares. Se añadió el buffer PE para lavar y eliminar los restos y se centrifugó durante 1 minuto. Finalmente, el ADN se obtuvo en 40 µL de mQH₂O.

Una vez el ADN estuvo purificado, se comprobó su pureza y su concentración.

La absorbancia de ADN se midió a 260 nm y a 280 nm. El cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleídos. Los cocientes de aproximadamente 1,8 a 2 corresponden a ADN puro. Si el cociente es inferior a dichos valores, el ADN contiene proteínas y en el caso de ser mayor, el ADN se ha contaminado con ARN y la lectura a 260 nm puede ser una suma de ADN y ARN alterando el valor de concentración para ADN (Krebs, 1940).

Los valores de las absorbancias fueron dados por Infinite M200 Tecan (Explicado en la sección 6.1.1).

La concentración del ADN se calcula a través de la ecuación de la Ley de Lambert-Beer que estipula que la absorbancia tiene una relación lineal con la concentración de la macromolécula:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Ecuación 5 Ley de Lambert-Beer

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, c la concentración y l es el paso de luz de la cubeta.

La concentración del ADN generado fue de **304,85 µg/mL**. (cálculos en Anexo G)

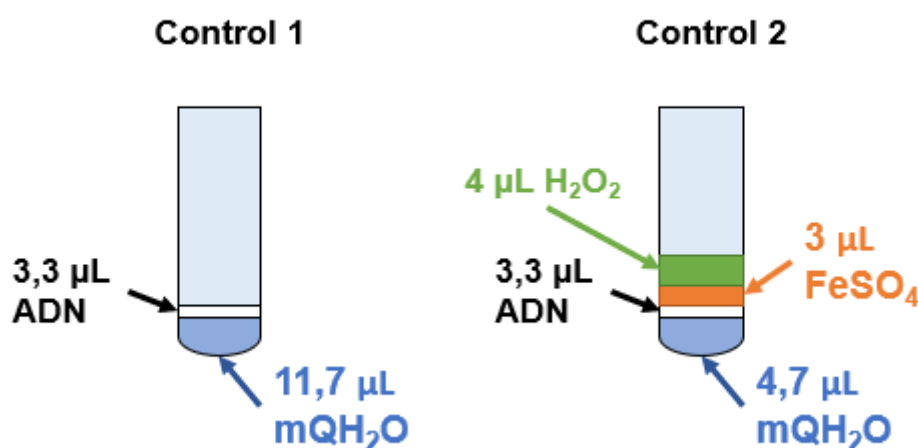
6.2.6.2. Prevención de la oxidación en ADN

El método de prevención de la oxidación en ADN permite visualizar ADN plasmídico o fragmentos del mismo en la electroforesis en gel de agarosa, donde se separan en función de su tamaño. Esta técnica consiste en someter la mezcla de moléculas de ADN en un gel de agarosa a un campo eléctrico. Las moléculas de ADN son atraídas al polo positivo debido a la carga neta negativa de ambas cadenas consecuencia de sus grupos fosfato. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que las grandes al verse menos “frenadas” en su desplazamiento por el entramado del gel de agarosa. Cuando los fragmentos se

han separado, el gel se sumerge en una solución que contiene bromuro de etidio y luego se ilumina con luz UV para visualizarlo (Caballero et al., 2007).

El ensayo se basa en el hidróxido producido en la reacción entre FeSO_4 y H_2O_2 . Durante esta reacción, el H_2O_2 se divide en $-\text{OH}$ por transferencia de electrones de hierro según la reacción: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + -\text{OH} + -\text{OH}$. Debido a la formación de $-\text{OH}$, una especie altamente reactiva y fuertemente oxidante, durante la reacción, la configuración inicial del ADN plasmídico se degrada de tal manera que presentan propiedades de movilidad electroforética alteradas (Leba et al., 2014).

Para realizar el ensayo, una vez purificado el ADN, se prepararon las muestras. En primer lugar, los controles: Control 1 (No oxidado) y Control 2 (Oxidado). El control 1 se compuso por 1 μg de ADN (3,3 μL según los cálculos de la ecuación y mQH_2O . Por lo tanto, en este control no se produce la reacción y no habrá oxidación. La reacción se produjo en el control 2 al contener FeSO_4 (0,08 mM) y H_2O_2 . (Esquema 16)



Esquema 16 Controles de ensayo en prevención de oxidación en ADN

Es necesario 1 μg de ADN para cada muestra;

$$1\mu\text{g de ADN} \cdot \frac{1\text{ mL}}{304,85\mu\text{g}} = 3,3\mu\text{L}$$

Así pues, se utilizarán 3,3 μL del ADN purificado para cada muestra.

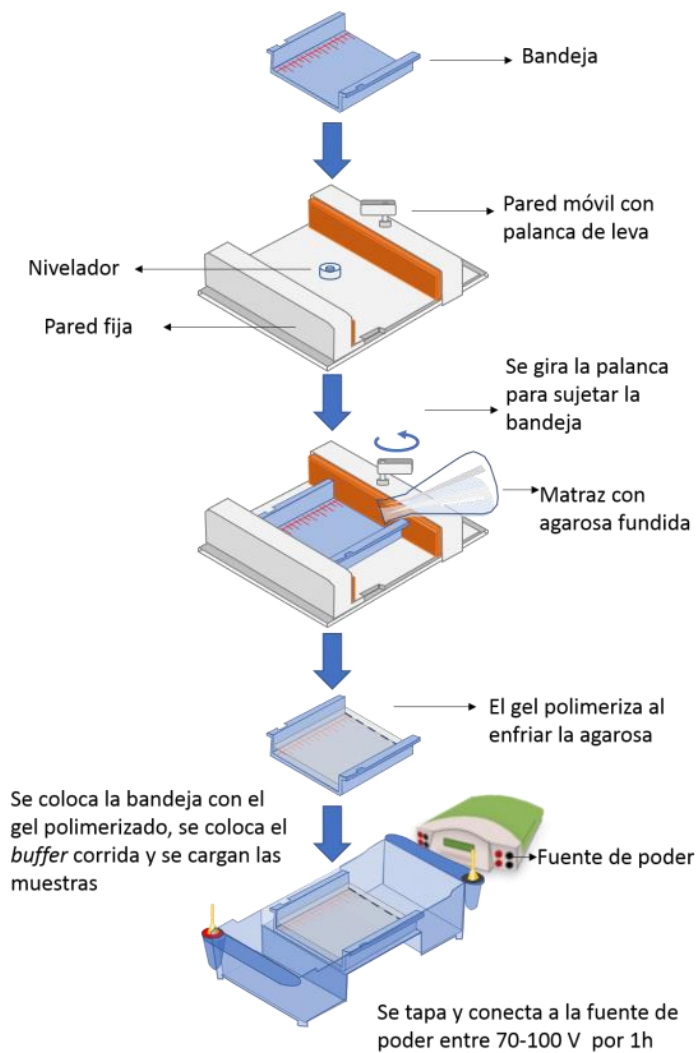
Las muestras con SLN contenían 1 μg de ADN (3,3 mL), 3 μL de FeSO_4 , 4 μL de H_2O_2 y 1,7 μL de mQH_2O y finalmente 3,3 μL de las distintas muestras de SLN (vacías con PVA, Q_{10} , Ru y Q_{10}/Ru) a una concentración de 10,40 % para poder obtener finalmente la concentración de 2,08 %. Después, se pusieron a

centrifugar en la minicentrífugadora para mezclar bien los componentes y seguidamente se pusieron a incubar a 37°C por 1 hora.

En el transcurso de la hora, se preparó el gel con un 1 % de agarosa y tampón TAE en un matraz y con la ayuda de un microondas se fundió y disolvió la agarosa. Una vez disuelta se preparó el molde del gel y los pozos donde se introdujeron las muestras más adelante.

Pasada la hora de incubación, se prepararon las muestras para posteriormente inyectarlas en el gel. Para ello se les añadió 3 µL de tampón de carga que contiene el colorante azul de bromofenol (3,3,5,5 -tetrabromofenol sulfonftaleína) a cada una de las muestras. Este compuesto es de color azul y se mueve más rápido que la mayoría de las moléculas de ADN al ser de menor tamaño, marcando así el frente y, puesto que es visible por su coloración, permite parar la electroforesis antes de que las moléculas de ADN se salgan del gel.

Finalmente, se colocó el gel en la cubeta de electroforesis, de manera que los pozos quedaron orientados en el polo negativo y el polo positivo en el otro extremo del gel, hacia donde debe moverse el ADN y se cubrió con TAE. Se cargaron 17 µL de las muestras en los pozos del gel, se tapó y se aplicó una corriente eléctrica continua de 100 V durante 1 hora.



Esquema 17 Proceso elaboración de gel de agarosa para electroforesis

Proceso de electroforesis. Referencia: Checa Rojas, A (2017) "Método Gel de electroforesis Agarosa". En línea. Disponible en: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>. Consultado el 28 de diciembre del 2019.

A medida que pasó el tiempo se observó, con el azul de bromofenol, como se dirigían al polo positivo tal y como se muestra en la figura 25.

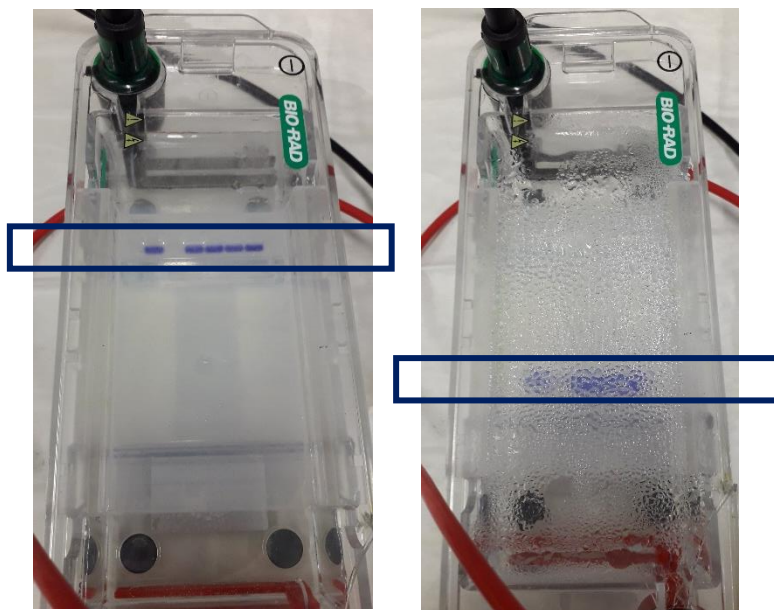


Figura 25 Recorrido de las muestras por efecto de un campo eléctrico

Recorrido de las muestras por efecto de un campo eléctrico continuo de 100 V para las muestras con una concentración del 20 %. Los resultados de estas muestras se encuentran en el Anexo H.

Pasada la hora, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (EtBr). Este compuesto se intercala entre los pares de bases del ADN y se vuelve fluorescente cuando está unido a él. Para visualizarlo se le aplicó luz ultravioleta. Las bandas de fluorescencia correspondientes a las moléculas de ADN se vieron al iluminarlas con luz UV en BioRad Chemidoc XRS (explicado en la sección 6.1.1.).

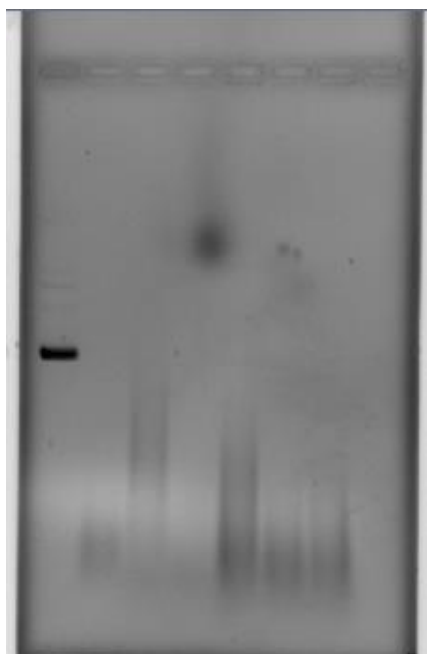


Figura 26 Prevención de la oxidación en ADN. Bandas fluorescentes.

Las muestras fueron inyectadas de la siguiente forma: 1). Control 1, 2) Control 2, 4). SLN Empty PVA. 5) SLN Q₁₀, 6) SLN Ru. 7). SLN Q₁₀/Ru

Como se puede ver en la figura 26, si se comparan las muestras de ADN oxidadas en presencia de las SLN (líneas 4, 5, 6, 7 del gel) con el control 1 (línea 1 del gel), ADN no oxidado, donde la banda de ADN sale muy bien definida, y con el control 2 (línea 2 del gel), ADN oxidado, donde el ADN se intuye a partir de un degradado de diversas bandas no muy bien definidas en la parte inferior de la figura, se interpreta que las distintas SLN generadas no tienen un efecto antioxidante a nivel ADN ya que se observa un degradado más o menos similar al del control 2. Este ensayo se repitió sin diluir las muestras de SLN previamente a la mezcla con el ADN, obteniendo una concentración final del 20 % y se sacaron las mismas conclusiones. La repetición del ensayo se encuentra en el Anexo H.

7. Presupuesto

El presupuesto de este estudio se encuentra de forma detallada en el documento **presupuesto** adjunto a este documento donde se tienen en cuenta los gastos de recursos humanos, materiales y productos químicos utilizados. Sumando un total de aproximadamente **6.767 €**.

8. Implicaciones ambientales

Las implicaciones ambientales de este estudio se evaluaron teniendo en cuenta el tratamiento de residuos en el laboratorio a lo largo de la realización de los ensayos.

Se ha de tener una previsión de los tipos de residuos que se generan en los laboratorios para ser bien almacenados y que haya una correcta recogida. Los residuos químicos para la recogida se organizan de la siguiente forma: (Laboratorios UPC, n.d.)

- **Grupo 1: Disolventes halogenados y clorados** (líquidos orgánicos con más del 1 % de halógeno)
- **Grupo 2: Disolventes no halogenados clorados** (líquidos orgánicos con menos del 1 % de halógeno)
- **Grupo 3: Disoluciones acuosas**
 - Inorgánica
 - Básica (concertada y diluida)
 - Ácida diluida
 - Metales pesados
 - Cromo (VI)
 - Reveladores, cloruros, sulfatos, etc.

Orgánica

Colorantes

Formol, fenol, glutaraldehído, etc.

Mezclas agua/disolvente

- **Grupo 4: Ácidos concentrados** (ácidos orgánicos y soluciones acuosas con una concentración mayor al 10 %)
- **Grupo 5; Aceites** (Aceites minerales de baños calefactados y de mantenimiento)
- **Grupo 6: sólidos** (Orgánicos y pastosos halogenados y no halogenados, Inorgánicos no especialmente tóxicos ni reactivos, absorbente contaminado, Envases contaminados, vidrio contaminado, roto o entero, etc.)
- **Grupo 7: Especiales** (Productos con elevada peligrosidad y que no se incluyen en los otros grupos incluyendo reactivos caducados)

Los residuos que se han generado a lo largo del estudio se han separado según su grupo. El laboratorio cuenta con indicaciones y distintos depósitos para cada uno de ellos.

Los residuos más abundantes fueron los residuos sólidos ya que se utilizaron más de 30 *eppendorfs*, *falcons* y placas de Petri para los ensayos teniendo en cuenta que varios se repitieron. Estos “envases”, al contaminarse, se convertían en residuos del grupo 6. Por otra parte, los reactivos y productos utilizados pertenecen en su mayoría al grupo 3. Aunque también se generaron algunos residuos de los otros grupos.

El laboratorio cuenta con una empresa dedicada a tratar los residuos. Éstos son propiamente etiquetados y se recogen cada 6 meses por la compañía SITA SPE IBÉRICA, S.L.U.

9. Conclusiones

Durante este estudio se ha podido validar la eficiencia antienvjecimiento de las SLN y se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- **Derivadas de la caracterización de las SLN:**
 - **El potencial zeta** se encuentra entre -15 y -20 mV y no se ha observado ninguna precipitación, por lo tanto, se han obtenido nanopartículas que presentan una estabilidad a largo plazo.
 - **El tamaño** de todas las NPs es de un rango de 500 y 700 nm con **índices de polidispersión** bajos. Por lo tanto, los métodos de sonoquímica y homogenización a alta presión permiten generar nanopartículas reproducibles con tamaño similar.
- **Derivadas de las bioactividades de las SLN:**
 - **Actividad antioxidante:** SLN Q₁₀/Ru muestran una capacidad antioxidante de 40 %, casi el doble más alta que la obtenida con NPs de Q₁₀ o Ru individualmente, por lo tanto, las NPs con los dos activos son los mejores antioxidantes. La nanoformulación de estos activos proporciona un incremento sinérgico de su actividad antioxidante.
 - **Inhibición de elastasa y colagenasa:** Los resultados muestran alta inhibición también en las NPs que no contenían activos (empty PVA). Este resultado puede ser debido a varios motivos: i) un problema artefactual o ii) los componentes que conforman las SLN, PVA y ácido palmítico, interaccionaron con los fluoróforos u otros reactivos utilizados durante el ensayo. La inhibición de estas dos enzimas es pre-requisito para una eficiencia antiedad.
 - **Biocompatibilidad.** Todas las SLN presentan alta biocompatibilidad a concentraciones de 4,16 % e inferiores y son adecuados para usos en vivo.
 - **Actividad antioxidante celular:** Los resultados muestran alta actividad antioxidante celular ya en las SLN que no contenían activos (empty PVA) probablemente debido a un efecto artefactual.

- **Actividad antioxidante en el ADN:** Las SLN generadas no tienen actividad antioxidante en el ADN.
- **Protección a la luz ultravioleta:** Las SLN vacías (empty PVA) ya presentan cierto efecto protector, pero las SLN que contenían los activos mostraron más efecto, siendo las Ru NPs las que presentaron mayor número de células vivas.

En conclusión, las nuevas SLN generadas con los activos Q₁₀ y Ru son biocompatibles y presentan propiedades antioxidantes y antiedad.

10. Recomendaciones

Se recomienda utilizar otros métodos para determinar la capacidad inhibitoria de colagenasa y elastasa y actividad antioxidante celular para reducir las interferencias encontradas con las SLN vacías (Empty PVA).

11. Referencias

- Caballero, Moyano, Muñoz (2007). Purificación de ADN plámidico y electroforesis del mismo gen de agarosa. *Análisis de La Presencia de Organismos Genéticamente Modificados En Muestras de Alimentos*, 1–12.
- Castaño Amores, Hernández Benavides (2018). Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. *Ars Pharmaceutica*, 59(2), 77–84.
- Catalina Natalia Cheaburu-Yilmaz (2019). *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*.
- Choi, Lee, Kim, K., Joo, Shin, Lee, Lee, Kim, J., Kwon, Bin, Kim, Ahn, Cha (2016). Biological effects of rutin on skin aging. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(1), 357–363.
- Dureja, Dhiman (2012). Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of Ziziphus mauritiana and Ziziphus nummularia fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*, 6(3), 187–192.
- Escobar Aristizábal (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173–180.
- Farboud, Nasrollahi, Tabbakhi (2011). Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 611–617.
- Fernández Guarino (2019). *Beneficios de la coenzima Q10 sobre la piel*. En línea. Consultada: 12 de diciembre de 2019. Disponible en:

<https://madriderma.com/coenzima-q10-beneficios-piel-antienvjecimiento>

- Garlick, Courtice, Munoz-Marcus (1965). Plasma Lipoproteins in Hyperlipaemic States in Man and in the Rabbit. *Australasian Annals of Medicine*, 14(2), 102–110.
- Garzón Serra, Fernández (1953). *Las nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapéuticos*. 1–14.
- Hielscher (2007). *Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions*.
- Hoppe, Bergemann, Diembeck, Ennen, Gohla, Harris, Jacob, Kielholz, Mei, Pollet, Schachtschabel, Sauermann, Schreiner, Stäb, Steckel (1999). Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors*, 9(2–4), 371–378.
- Invitrogen Molecular Probes. (2005). LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells. *Product Information, Catalog Number: MP 03224*, 1–7.
- Isaac, C., Jiménez, E., Yane, E., Martínez, C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 52(2), 73–75.
- Orlandi (2011). *Nuevos ingredientes activos de uso en dermatología estética*. 27(2), 236–239.
- Jiménez Monreal, Sánchez Manzanera & Martínez Tomé (2012). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 28(0), 67–78.
- Kharaeva (2009). Clinical and biochemical effects of coenzyme Q(10), vitamin E and selenium supplementation to psoriasis patients. *Nutrition*, 25, 295–232.
- Krebs (1940). The citric acid cycle. *Biochemical Journal*, 34(3), 460–463.
- Kumar (2019). *Nanocarriers for Drug Delivery* (S. T. Shyam Mohapatra, Shivendu Ranjan, Nandita Dasgupta, Raghvendra Kumar (ed.)).
- Laboratorios UPC. (n.d.). *Recogida de residuos*. En línea. Consultada el 3 de enero de 2020. Disponible en: <https://eq.upc.edu/es/laboratorios/laboratorios#recollida-de-residus>
- Leba, Brunschwig, Saout, Martial, Vulcain, Bereau, Robinson, (2014). Optimization of a DNA nicking assay to evaluate Oenocarpus bataua and Camellia sinensis antioxidant capacity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18023–18039.
- Llabot, Palma (2008). *Nanopartículas poliméricas sólidas*.
- Mansego Talavera (2009). *Estudio de factores genéticos de los sistemas asociados con estrés oxidativo en la hipertensión*.
- Morales (2016). "Efecto de la actividad antioxidante de propóleos sonorenses sobre estado redox de células cancerígenas y su actividad antiproliferativa"

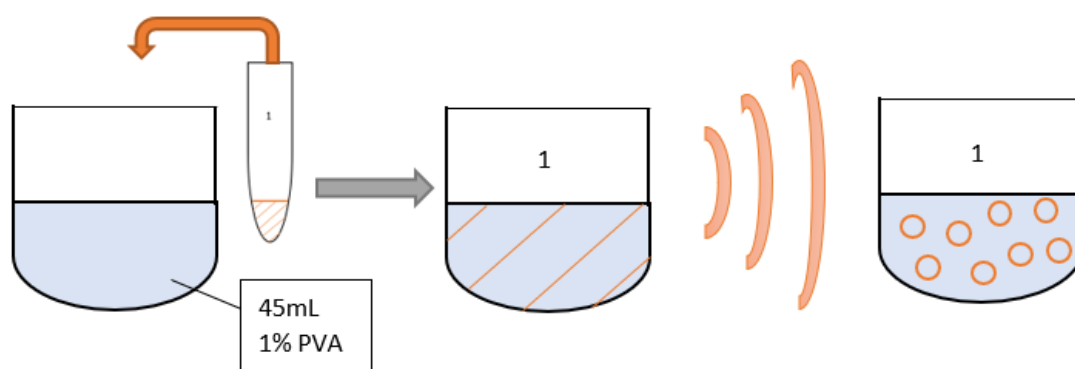
- Moulden, (2018). *El potencial Zeta y la química coloidal*. 4–6.
- Oehlke, Behsnilian, Mayer-Miebach, Weidler, Greiner (2017). Edible solid lipid nanoparticles (SLN) as carrier system for antioxidants of different lipophilicity. *PLoS ONE*, 12(2).
- Pérez Trueba, Martínez Sánchez (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 20(4), 297–306.
- Qiagen. (2012). QIAprep Miniprep Handbook. *QIAprep Miniprep Handbook*, May, 1–44.
- Rueda (2010). *Envejecimiento cutáneo*. 10–17.
- Sahu, Sahu, Sharma, Kumar Jha. (n.d.). "A review of current and novel trends for anti-ageing formulation". *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences IJPCBS*, 2014(1), 118–125.
- Sharma, B., & Sharma, A. (2012). Future prospect of nanotechnology in development of anti-ageing formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL.3), 57–66.
- Stemmler, B. (2016). *Coenzima Q10*. En línea. Consultada el 07 de enero de 2020. Disponible en: <https://lambertsusa.com/art-dsp/coenzima-q10/>
- Villafuerte Robles, García F, Garzón, Hernández, Vázquez R., (2008). Solid lipid nanoparticles | Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(1), 38–52.
- Wang, J., Wang, H., & Xia, Q. (2018). Ubidecarenone-loaded nanostructured lipid carrier (UB-NLC): Percutaneous penetration and protective effects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on HaCaT cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7).
- Wang, Wang, Zhou, Tang, Liu, Liu, Xia (2012). Physicochemical characterization, photo-stability and cytotoxicity of coenzyme Q10-loading nanostructured lipid carrier. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(3), 2136–2148.
- Wissing, Kayser, Müller (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257–1272.

Anexo A.- Proceso de ultrasonido en la preparación de las SLN

El proceso de ultrasonido en la preparación de las SLN se grafica en los esquemas siguientes para poder tener una visualización más clara del procedimiento. Este paso se realizó con el equipo de ultrasonido explicado en el apartado de la sección 6.1.1 de la memoria, donde la energía del sonido se utilizó para la generación de las nanopartículas.

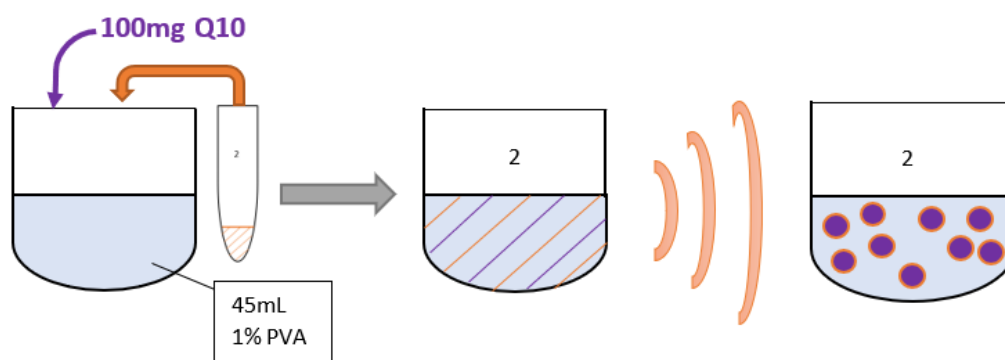
A continuación, se muestra el proceso con las distintas muestras y activos utilizados para finalmente obtener las SLN vacías, con los activos Q₁₀ y Ru, y finalmente la muestra con los dos activos en conjunto:

Nanopartículas vacías



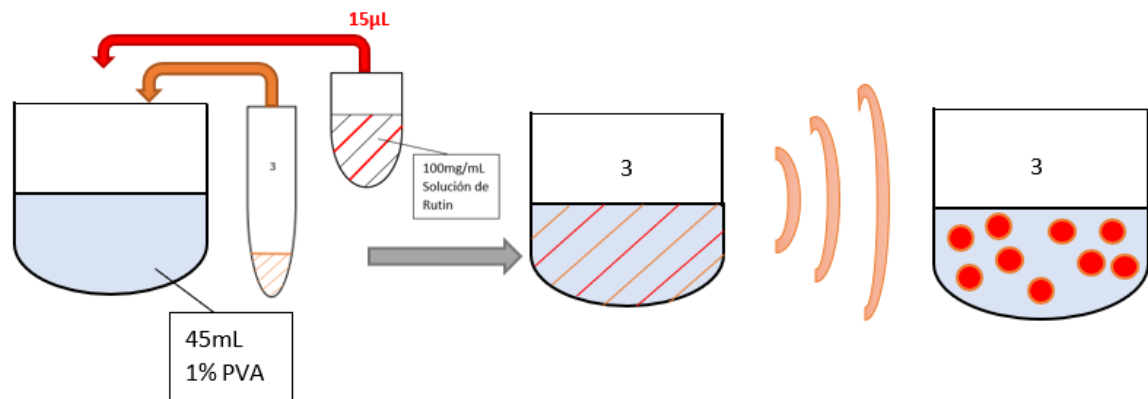
Esquema 18 Proceso de obtención de SLN vacías

Nanopartículas con Q₁₀



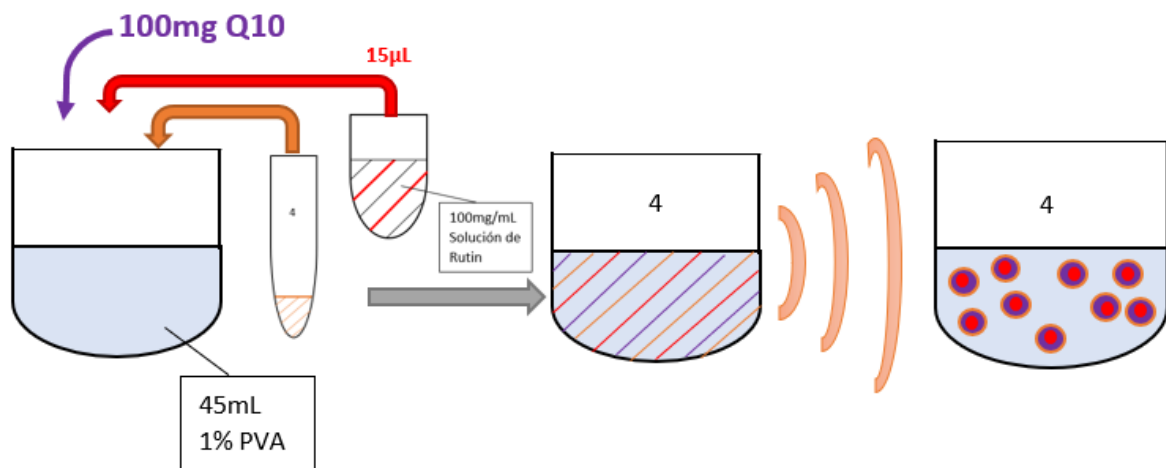
Esquema 19 Proceso de obtención de SLN con ubiquinona

Nanopartículas con Ru



Esquema 20 Proceso de obtención de SLN con Rutina

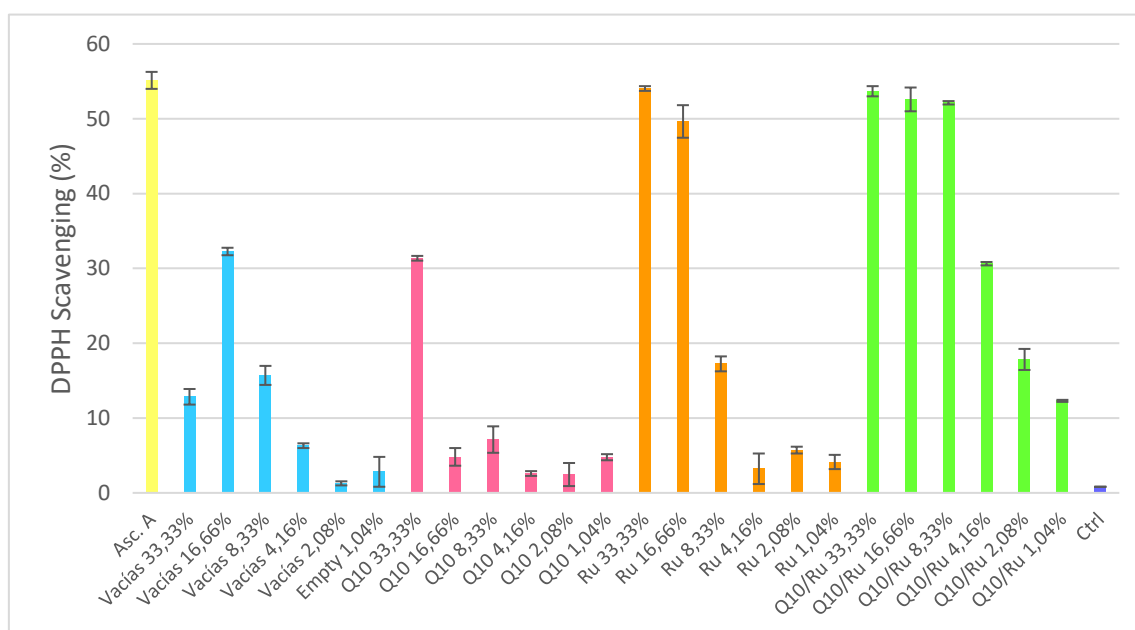
Nanopartículas con Q₁₀/Ru



Esquema 21 Proceso de obtención de SLN con ubiquinona y Rutina

Anexo B.- Comprobación de resultados

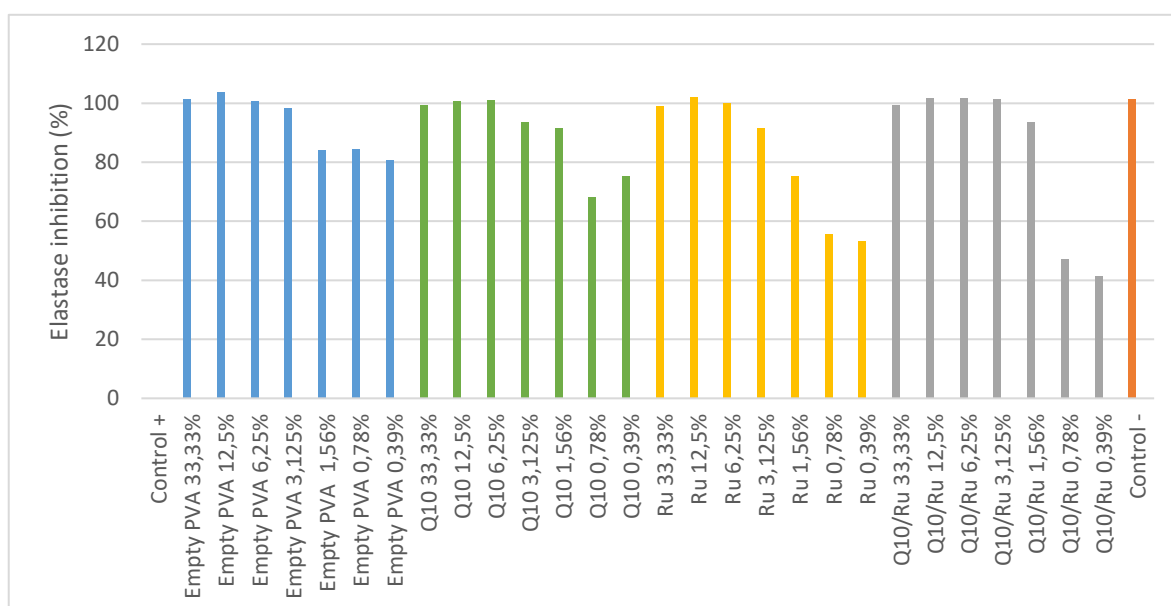
B.1. Actividad antioxidante con el radical DPPH



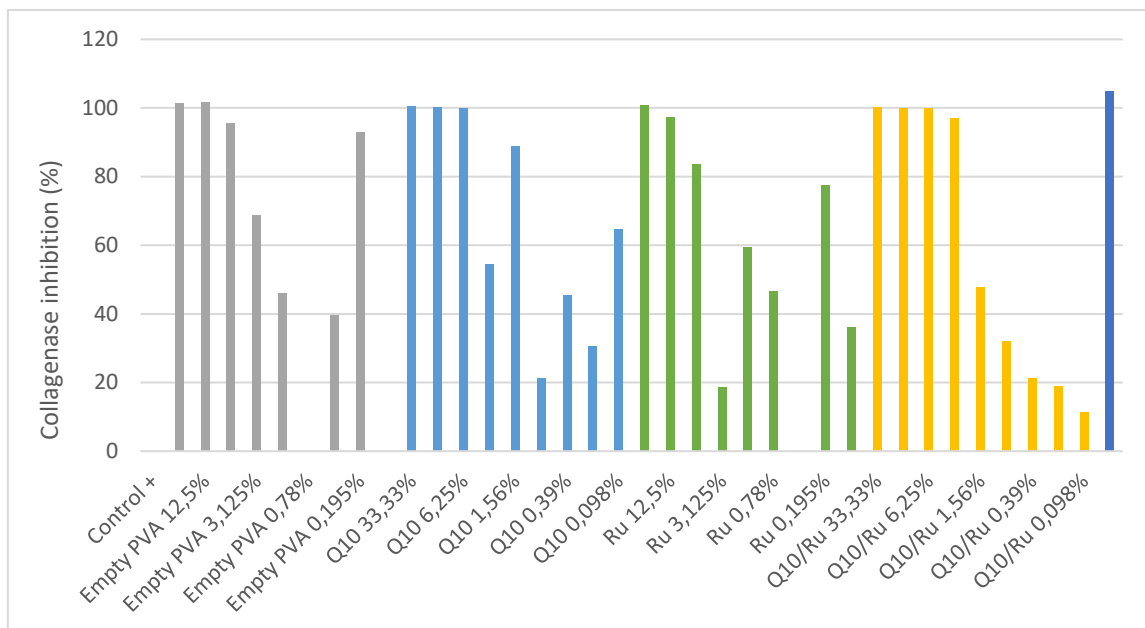
Gráfica 12 Comprobación de resultados de actividad antioxidante utilizando el radical DPPH

Se demuestra con los resultados de la gráfica que las NPs que contienen los dos activos (Q₁₀ y Ru), muestran mayor actividad antioxidante, así pues, los dos activos combinados tienen mayor capacidad de atrapar radicales libres que por separado.

B.2. Inhibición a la elastasa y colagenasa



Gráfica 13 Comprobación de resultados en inhibición a la elastasa

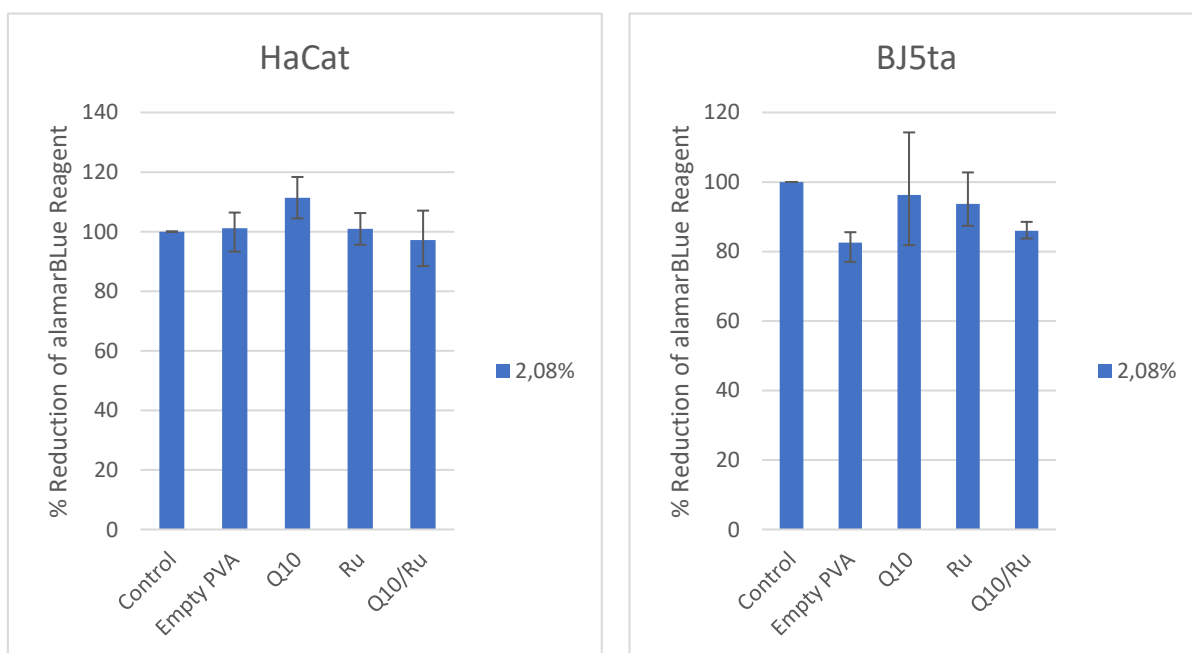


Gràfica 14 Comprobación de resultados en inhibición de la colagenasa

La repetición de estos ensayos confirma que los resultados no son concluyentes y por lo tanto no se pueden interpretar con respecto a la inhibición de la elastasa y la colagenasa.

B.3. Biocompatibilidad

A continuación, se muestra la gráfica 15 de la repetición del ensayo de biocompatibilidad realizado para confirmar que la concentración 2,08 % de las muestras de SLN es biocompatible con las células HaCat y BJ5ta.



Gràfica 15 Ensayo de biocompatibilidad (29 de octubre del 2019)

Anexo C.- Cálculos de los ensayos a nivel celular

C.1. Cálculo de la concentración de células por mililitro a través del recuento en cámara Neubauer.

Se contaron las células en cuadrículas de la cámara Neubauer, se hace la media y se multiplica por la inversa del volumen (10.000 mL^{-1}):

$$\text{Células HaCat} = \frac{89 + 87 + 96 + 79 + 97 + 94}{6} = 90,3 \text{ células HaCat}$$

$$90,3 \cdot 10.000 = 903.000 \frac{\text{células HaCat}}{\text{mL}}$$

$$\text{Células BJ5ta} = \frac{124 + 164 + 139 + 152 + 148}{6} = 145,4 \text{ células BJ5ta}$$

$$145,4 \cdot 10.000 = 1.454.000 \frac{\text{células BJ5ta}}{\text{mL}}$$

C.2. Cálculo placa de biocompatibilidad para una densidad de 60.000 células por pozo.

En primer lugar, se calcularon los pozos para el ensayo sabiendo que por cada pozo son $100 \mu\text{L}$. Se necesitaban un total de 18 pozos para cada célula (6 para los controles y 12 para las distintas muestras). Se prepararon 30 pozos de cada célula, de esta forma se aseguró que había suficientes células.

- Células HaCat:

$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{60.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{1.454.000 \text{ células HaCat}} = 1,2 \text{ mL}$$

- Células BJ5ta:

$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{60.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{903.000 \text{ células BJ5ta}} = 2 \text{ mL}$$

Por lo tanto, para las células HaCat se prepararon 3 mL ($100 \mu\text{L}$ para 30 pozos) de volumen final donde 1,2 mL de células HaCat preparadas se disolvieron en 1,8 mL de medio DMEM. Para las células BJ5ta, se prepararon 3 mL ($100 \mu\text{L}$

para 30 pozos) de volumen final donde 2 mL de células BJ5ta preparadas se disolvieron en 1 mL de medio DMEM.

C.3. Cálculo placa de actividad antioxidante para una densidad de 30.000 células por pozo.

En primer lugar, se calcularon los pozos para el ensayo sabiendo que por cada pozo son 100 μ L. Se necesitaban un total de 18 pozos para cada célula (3 para el control, 3 para el control con ácido ascórbico y 12 para las distintas muestras). Se preparó para 30 pozos cada célula, de esta forma se aseguró que había suficiente.

- Células HaCat:

$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{30.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{1.454.000 \text{ células HaCat}} = 0,6 \text{ mL}$$

- Células BJ5ta:

$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{30.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{903.000 \text{ células BJ5ta}} = 1 \text{ mL}$$

Por lo tanto, para las células HaCat se prepararon 3 mL de volumen final donde 0,6 mL de células HaCat preparadas se diluyeron en 2,4 mL de medio DMEM. Para las células BJ5ta, se prepararon 3 mL de volumen final donde 1 mL de células BJ5ta preparadas se disolvieron en 2 mL de medio DMEM.

C.3. Cálculo placa de actividad antioxidante para una densidad de 300.000 células por pozo.

En primer lugar, se calcularon los pozos para el ensayo sabiendo que por cada pozo son 2 mL. Se necesitaban un total de 5 pozos para cada célula (1 para el control y 4 para las distintas muestras). Al tener dos placas de 6 pozos por cada célula, se necesitaban 10 pozos y finalmente se prepararon 12 pozos, de esta forma se aseguró que había suficientes células.

- Células HaCat:

$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{30.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{1.454.000 \text{ células HaCat}} = 3 \text{ mL}$$

- Células BJ5ta:

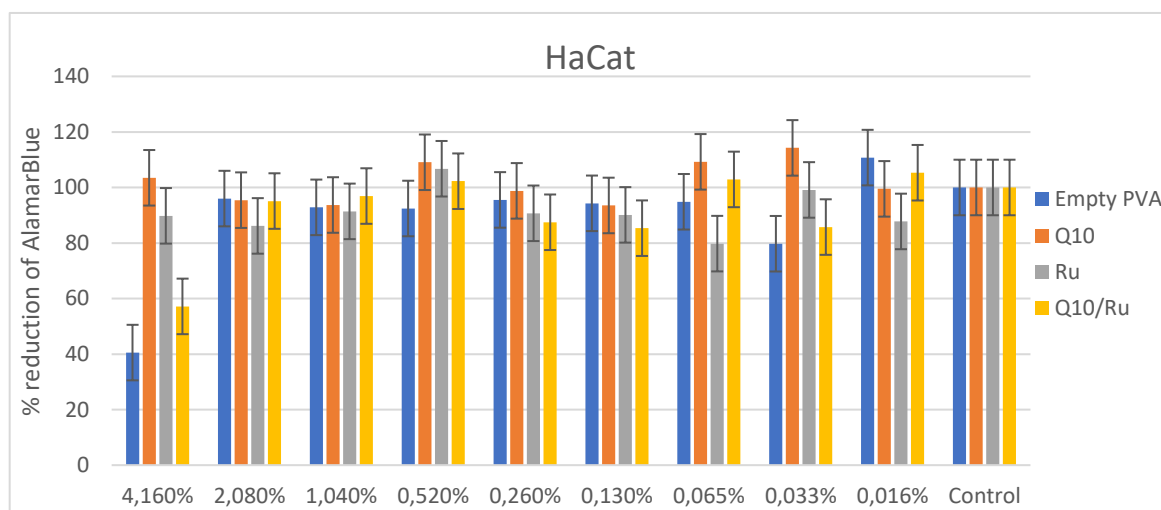
$$30 \text{ pozos} \cdot \frac{300.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{903.000 \text{ células BJ5ta}} = 4 \text{ mL}$$

Por lo tanto, para las células HaCat se prepararon 24 mL de volumen final donde 3 mL de células HaCat preparadas se diluyeron en 21 mL de medio DMEM. Para las células BJ5ta, se prepararon 24 mL de volumen final donde 4 mL de células BJ5ta preparadas se disolvieron en 20 mL de medio DMEM.

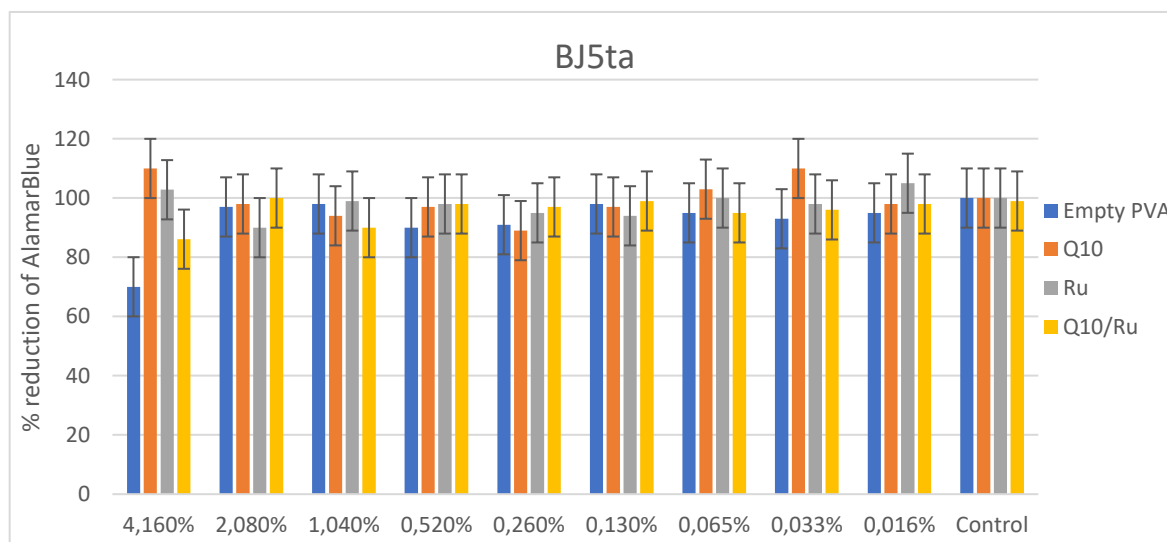
Anexo D.- Gráficas de biocompatibilidad para diferentes concentraciones

D.1. Concentraciones 4,16 % hasta 0,0016 %.

A continuación, se muestran las gráficas del ensayo de biocompatibilidad realizado para saber la concentración en la que las muestras eran compatibles con las células.



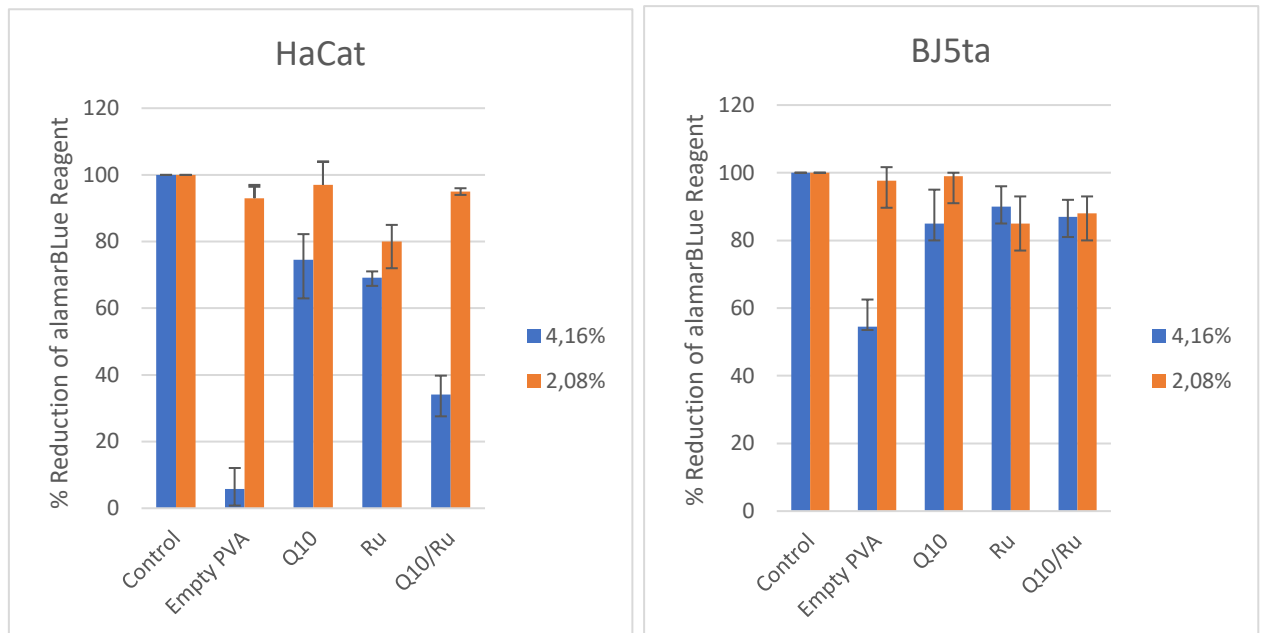
Gráfica 16 Biocompatibilidad para diferentes concentraciones en células HaCat



Gráfica 17 Biocompatibilidad para diferentes concentraciones en células BJ5ta

D.2. Concentraciones de 4,16 % y 2,08 %.

Se realizó posteriormente el ensayo de biocompatibilidad para las concentraciones de 4,16 % y 2,08 % para apreciar las diferencias.



Gráfica 18 Ensayo de biocompatibilidad para concentraciones de 4,16 % y 2,08 %

Anexo E.- Cambio de color en placas por efecto de AlamarBlue

En la imagen se muestra la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo de Biocompatibilidad. Como se puede observar, hay pozos más rosados que otros. El alamarblue (azul no fluorescente) se reduce en resorufina (rosado y fluorescente), proceso que se asocia principalmente con la mitocondria de células vivas



Figura 27 Componente Alamarblue y placa con los colores que se pueden obtener (azul y rosa)
Alamarblue y placa. Referencia: G-Biosciences. "Alamar Blue Cell Viability Assay" En línea. Consultada el 05 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.gbiosciences.com/Alamar-Blue-Cell-Viability-Assay>

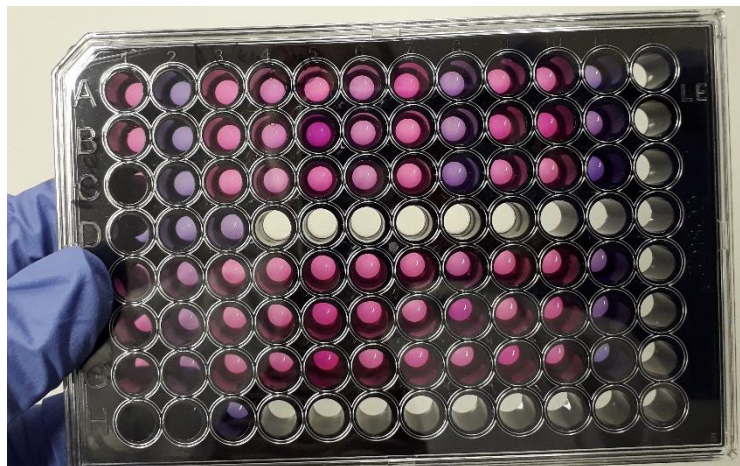
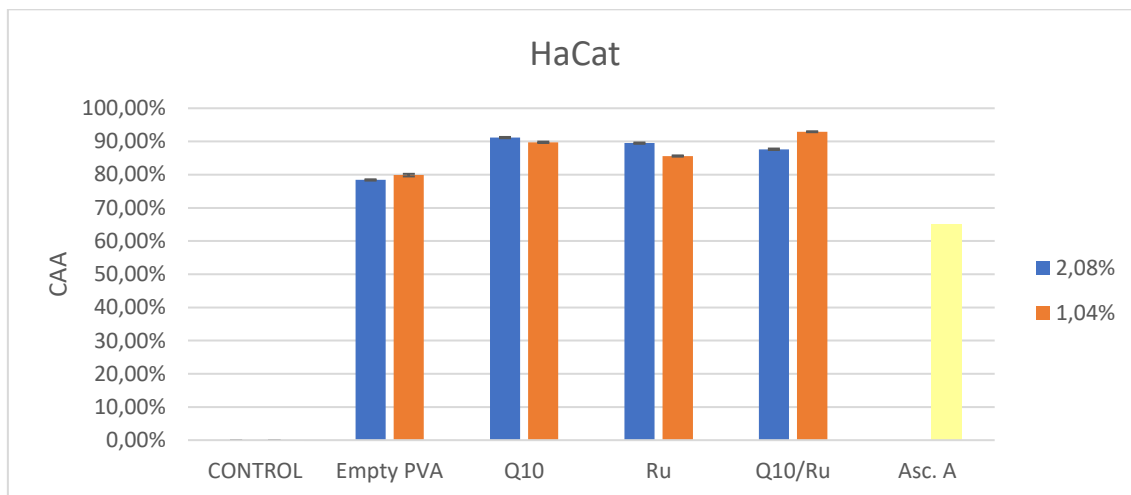


Figura 28 Cambio de color en placa de ensayo de biocompatibilidad en diferentes concentraciones

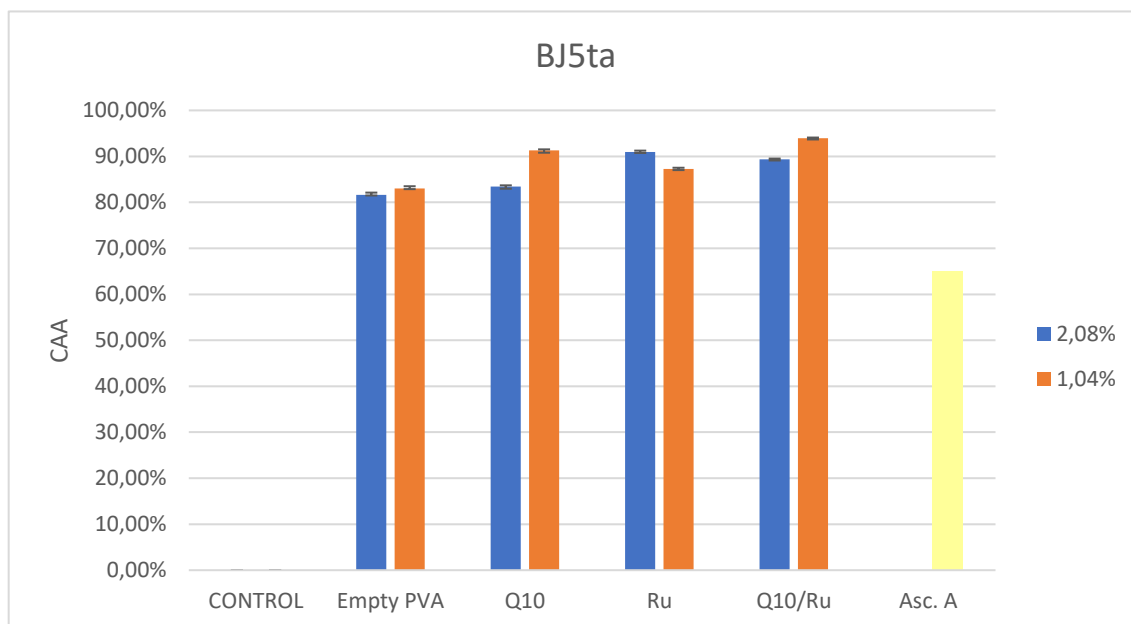
Los pozos que se encuentran de color azul al final de la placa y en la cuarta fila son pozos en los que no había células.

Anexo F.- CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04%

Los resultados de la actividad antioxidante se repitieron para comprobar los resultados obtenidos. Se realizaron en concentraciones menores, y como se ve en los resultados de las gráficas 20 y 21, la actividad antioxidante no varía prácticamente de una concentración de 2,08 % a 1,04 %.



Gráfica 19 CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04 % en células HaCat



Gráfica 20 CAA para concentraciones de 2,08 % y 1,04 % en células BJ5ta

Anexo G.- Cálculos en ensayos con ADN

Para el cálculo de la concentración del ADN y determinación de su grado de pureza, se obtuvieron en primer lugar los valores de absorbancia del ADN purificado en longitud de onda 260 nm, 280 nm y 350 nm.

Absorbancia (260 nm)	Absorbancia (280 nm)	Absorbancia (350)
0,0998	0,0533	0,0127

Tabla 3 Valores de absorbancia del ADN

El cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleídos.

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{0,0998}{0,0533} = 1,87$$

Los cocientes para ADN puro son aproximadamente de 1,8 a 2.

Una vez obtenidas las absorbancias y la estimación de pureza del ADN, confirmando así que los valores de absorbancia no se deben a restos de proteína en la cubeta o fallos en la purificación, se utilizó la Ley de Lambert-Beer para calcular la concentración del ADN:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, c la concentración y l es el paso de luz de la cubeta.

La absorbancia se refiere a la diferencia entre la absorbancia obtenida a 260 nm y la absorbancia obtenida a 350 nm que sería la línea.

$$A_{260} - A_{280} = 0,0465$$

El coeficiente de extinción molar tiene un valor de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para DNA.

El paso de la luz de la cubeta es de 1 cm. Se debe considerar también el factor de dilución de 70.

Aplicando los valores;

$$c = \frac{0,0465}{0,02 \cdot 1/70} = 304,85 \mu\text{g/mL}$$

Anexo H.- Ensayo prevención de la oxidación en ADN con concentración del 20 %

El ensayo se repitió sin diluir las muestras previamente obteniendo una concentración final del 20 % en las muestras de esta forma se podía saber si los resultados inicialmente obtenidos eran a causa de la alta dilución de las muestras.

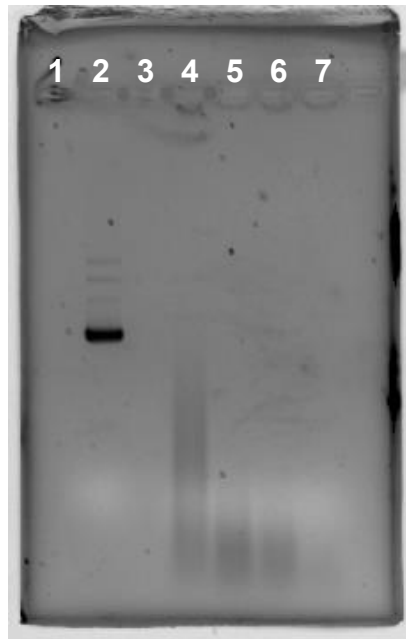


Figura 29 Prevención de la oxidación en ADN. Bandas de fluorescencia.

Las muestras fueron inyectadas de la siguiente forma: 2). Control 4). SLN Empty PVA. 5) SLN Q₁₀, 6) SLN Ru. 7). SLN Q₁₀/Ru